

**Charakterisierung und Kartierung
der Genprodukte von Herpesvirus Saimiri**

Wolfgang Hell

1989

Disbui. München

1989



CHARAKTERISIRUNG UND KARTIRUNG
DER GEMPRODUKTEN DES FESVIRUS SACHRI

Digitized by the Internet Archive
in 2026

CHARAKTERISIERUNG UND KARTIERUNG DER GENPRODUKTE VON HERPESVIRUS SAIMIRI

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Ludwig-
Maximilians-Universität München**

vorgelegt von Wolfgang Hell

**durchgeführt am Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische
Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Abt.: Molekulare Virologie, Prof. Dr. H. Wolf**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bandlow

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Jäckle

Sonderberichterstatter: Prof. Dr. H. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 6. 1989

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	8
Einleitung	10
1. Die Herpesviren: Biologie, molekularer Aufbau, Klassifikation	10
2. Genexpression und ihre Regulation	14
3. Latenz	15
4. Transformation und Oncogenität	17
5. Herpesvirus salmuri	20
6. Aufgabenstellung	31
Material und Methoden	33
1. Biologisches Material	33
2. Zellkultur	33
3. Virusvermehrung	34
4. RNA-Extraktion aus OMK-Zellen	34
5. In vitro Translation	35
5.1. Präparation des Retikulozyten-Lysats	35
5.2. Nuclease-Verdau des Rohlysats	36
5.3. Translationsansatz	37
5.4. Translation und Processing	37
6. Immunpräzipitation	38
7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
8. Plasmidpräparation	40
9. Hybrid-Selektion von HVS-spezifischen mRNAs	42
10. Elektrophorese und Blotten von RNA	43
11. Elution von DNA-Banden aus Agarosegelen	43
12. Hybridisierung von Northern Blots	44
Ergebnisse	46
1. Virusvermehrung und RNA-Extraktion	46
2. Translation von GesamtRNA-Proben	47
2.1. Das in vitro Translationssystem	47
2.2. Translation von GesamtRNAs ohne Immunpräzipitation	48
2.3. Translation und Immunpräzipitation mit HVS-spezifischen Kaninchen- und Affenserum	50
2.4. Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern	56

3. Translation von hybrid-selektierten mRNAs
 - 3.1. Translation ohne Immunpräzipitation
 - 3.2. Processing
 - 3.3. Translation und Immunpräzipitation mit Kaninchenserum
 - 3.4. Translation und Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern
4. Homologien zwischen EBV und Herpesvirus saimiri
5. Die immediate early Genprodukte
6. Frühe und späte Transkripte von Herpesvirus saimiri

Diskussion

1. Allgemeines zur Untersuchung der Genexpression bei Herpesviren
2. Die immediate early Genprodukte
3. Frühe und späte Genprodukte
4. Homologien zu anderen Herpesviren

Literatur

- Anhang:
1. eigene Veröffentlichungen
 2. Danksagung
 3. Lebenslauf

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bp	Basenpaar
Cl	Curie
CMV	Cytomegalovirus
CPE	Cytopathogener Effekt
CX	Cycloheximid
Da	Dalton
DATD	Diallyltartardiamid
DBP	DNA-bindendes Protein
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EA	frühes Antigen (early antigen)
EBNA	EBV-assoziiertes nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylenether)N,N'-Tetraessigsäure
GC	Guanosin + Cytosin
HHV	Humanes Herpesvirus
HSV	Herpes-simplex-Virus
HVS	Herpesvirus saimiri
ICP	Infected cell protein
IE	Immediate early
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LA	spätes Antigen (late antigen)
M	molar
MDa	Megadalton
mM	millimolar
MA	Membranantigen
MEM	minimal essential medium
min	Minute
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NPC	Nasopharynxkarzinom

OMK	owl monkey kidney cells (Nierenepithelzellen von Nachtaffen)
PAA	Phosphonoessigsäure
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFU	plaque forming unit
PRV	Pseudorabies-Virus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	NaCl/Natriumcitrat-Puffer
Std	Stunde
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
T _m	Schmelzpunkt
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
TS	Thymidylat-Synthase
Vol.	Volumen
VZV	Varicella-Zoster-Virus

ZUSAMMENFASSUNG

Herpesvirus saimiri (HVS) gehört zu den lymphotropen Herpesviren, die in ihren natürlichen Wirtstieren oder in künstlich infizierten verwandten Spezies lymphoproliferative Erkrankungen hervorrufen können. Der natürliche Wirt von Herpesvirus saimiri sind die südamerikanischen Totenkopffaffen, die nach der Infektion jedoch keine Anzeichen einer Erkrankung erkennen lassen. Zu der gleichen Gruppe von Herpesviren zählt auch das humanpathogene Epstein-Barr-Virus (EBV), das mit zwei Tumorerkrankungen des Menschen kausal in Verbindung gebracht wird. Einerseits bedingt die horizontale Verbreitung dieser Viren die Fähigkeit, sich zumindest in bestimmten Wirtszellen unter Zellyse produktiv zu vermehren, andererseits ist die Latenz der Viren essentielle Voraussetzung für die neoplastische Wirkung. Der Regulation der Genexpression kommt damit eine zentrale Bedeutung in der Biologie dieser Viren zu.

Die virale Genexpression ist vom Typ der Wirtszelle abhängig. Der lytische Vermehrungszyklus ist bei den vom Genom her relativ großen Herpesviren in einem zeitlich abgestuften kaskadenartigen System organisiert, wobei zwischen ganz frühen ("immediate early"), frühen und späten Genprodukten unterschieden werden kann. Die Untersuchung der Genexpression von Herpesvirus saimiri in lytisch infizierten Nierenzellkulturen wurde bisher vor allem auf der Ebene der Proteinsynthese durch in vivo Markierung untersucht. Von der DNA-Sequenz des viralen Genoms sind bislang nur kurze Stücke bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung der Genexpression auf RNA-Ebene durchgeführt. RNA wurde in verschiedenen Phasen der Virusinfektion extrahiert und dann zur Analyse der zugehörigen Polypeptide in vitro translatiert oder in Northern Blots auf die viralen Transkripte hin untersucht. Durch die in vitro Translation von hybrid-selektierten viralen mRNAs konnten über 50 virale Polypeptide ihren kodierenden Regionen auf dem HVS-Genom zugeordnet werden. 20 davon gehören zu der Klasse der frühen Genprodukte, die unabhängig von einer Replikation der viralen DNA synthetisiert werden. Über die Hybridisierung von Northern Blots wurden mehr als 75 virus-spezifische Transkripte identifiziert, von denen einige als unprozessierte Vorstufen anzusehen sind. Mehrere RNAs konnten mit den Polypeptiden korreliert werden.

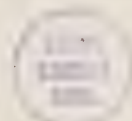
Drei sogenannte immediate early Gene werden bei Herpesvirus saimiri als erstes exprimiert, ohne daß bis dahin virale Proteine in den Zellen synthetisiert worden sind. Wenigstens eines dieser drei Produkte hat dann die Aufgabe, die frühen und späten Gene des Virus anzuschalten.

Mit verschiedenen Antisera und einer Reihe von monoklonalen Antikörpern konnten viele virale Translationsprodukte näher charakterisiert werden. Zudem wurden durch die Immunpräzipitation auch Homologien zwischen HSV und EBV nachgewiesen. Die eigenen Ergebnisse konnten in vielen Fällen mit den Daten anderer Arbeitsgruppen korreliert werden, wodurch ein genaueres Bild der Genexpression bei Herpesvirus saimiri erhalten werden konnte.

EINLEITUNG

1. Die Herpesviren: Biologie, molekularer Aufbau, Klassifikation:

Betrachtet man das morphologische Erscheinungsbild sowie die Grundzüge des viralen Reproduktionszyklus, so bildet die Familie Herpesviridae eine recht einheitliche Gruppe von DNA-Viren. Herpesviren, von denen bisher mehr als 80 Spezies beschrieben wurden, finden sich als Parasiten bei den unterschiedlichsten Vertretern des Tierreichs, bei Primaten, Huftieren, Vögeln, Amphibien bis hinab zu den wirbellosen Tieren wie z.B. Schwämmen (ROIZMAN 1982; ROIZMAN und BATTERSON 1985). Gemeinsam ist ihnen der Aufbau des Virions aus dem genomtragenden "core", dem stets Ikosaederförmig aus 162 Kapsomeren aufgebauten Kapsid sowie einer äußeren Hüllmembran, dem "envelope". Der Bereich zwischen Kapsid und Hülle wird als Tegument bezeichnet (ROIZMAN und FURLONG 1974). Die Virushülle selbst ist eine typische Lipid-Doppelmembran mit Proteineinlagerungen, die zum Teil viruskodiert sind. Sie entstammt der inneren Kernmembran der Wirtszelle und legt sich bei der Virusknospung aus dem Zellkern heraus, dem "budding", um das Viruskapsid herum, wobei der Tegumentbereich als wenig strukturierter Zwischenraum mit eingeschlossen wird. Die Größe der infektiösen Viruspartikel liegt bei 120 - 300 nm, je nach Spezies. Damit gehören die Herpesviren neben den Pockenviren zu den größten, bei Tieren vorkommenden Viren. Unterschiedliche Größen bei den Herpesviren sind in erster Linie bedingt durch verschieden dicke Tegumentbereiche, während die Kapside wenig variieren. Verschieden groß sind daneben auch die Genome der einzelnen Herpesvirusarten. Überhaupt steht die Variabilität des Genomaufbaus in großem Gegensatz zur morphologischen Homogenität dieser Virusgruppe. Zwar liegt das Herpesvirusgenom immer als eine lineare doppelsträngige DNA vor, aber die Größe (80 - 150 Mill. Da), die erstaunliche Bandbreite im GC-Gehalt (zwischen 32 und 75%) sowie die qualitativ und quantitativ ganz unterschiedliche Ausstattung der Genome mit repetitiven Sequenzen ergeben eine Vielzahl verschiedener Genome, die sich, soweit bis jetzt untersucht, grob in ein Schema von 5 Grundtypen einordnen lassen, wie es in Abb. 1 gezeigt ist (ROIZMAN und BATTERSON 1985). Hinzu kommt, daß auch innerhalb einer Spezies Schwankungen in der Genomgröße bis zu 20 kbp auftreten können, welche durch eine unterschiedliche Zahl von meist randständigen repetitiven Sequenzen hervorgerufen werden.



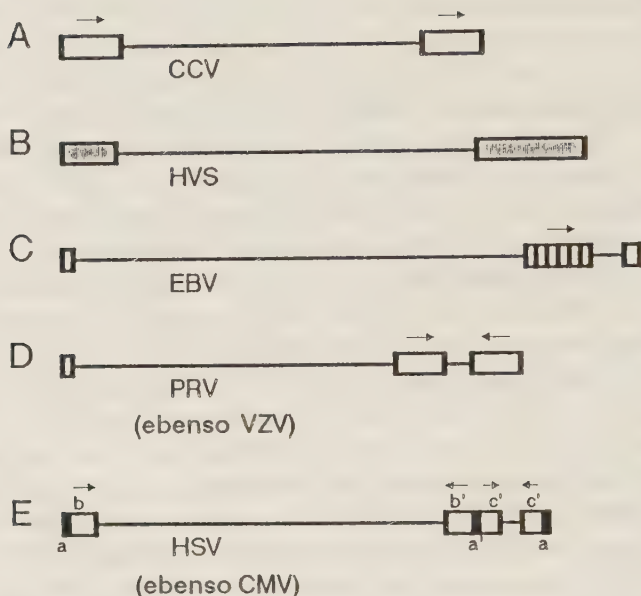


Abb. 1: Schematische Darstellung der bei Herpesviren vorkommenden Genomtypen (nach ROIZMAN und BATTERSON 1985)

Graue Rechtecke stellen Bereiche dar mit Tandem-Repeats von kleineren DNA-Sequenzen (<1500 bp), weiße Rechtecke geben größere Sequenzen an, die im gleichen Genom zwei- oder mehrfach auftreten (Pfeile deuten dabei die Richtung zueinander an). Die schwarze durchgezogene Linie steht für Genombereiche ohne Repeats.

CCV = Channel Catfish Virus

HVS = Herpesvirus saimiri

EBV = Epstein-Barr-Virus

PRV = Pseudorabies-Virus

VZV = Varizella-Zoster-Virus

HSV = Herpes-simplex-Virus

CMV = Cytomegalovirus

Nach den biologischen Eigenschaften hat man die Familie der Herpesviren in 3 Gruppen unterteilt (ROIZMAN et al. 1981):

(1) Alphaherpesviren: Diese Unterfamilie zeichnet sich aus durch eine geringe Wirtsspezifität und einen relativ kurzen Replikationszyklus mit rasch voranschreitender Zerstörung infizierter Zellen. Sie lassen sich daher leicht in Zellkulturen vermehren. Die meisten Vertreter dieser Gruppe können zu latenten Infektionen führen, wobei die Viren bevorzugt in Nervenzellen überdauern. Zu den Alphaherpesviren gehören die humanpathogenen Herpes-Simplex-Viren 1 und 2 (HSV 1, HSV 2; nach der neueren Klassifikation von ROIZMAN et al. werden sie als humane Herpesviren 1 und 2 bezeichnet) und Varicella-Zoster-Virus (VZV; =humanes Herpesvirus 3) sowie das Pseudorabiesvirus (PRV; =porcines Herpesvirus 1), der Erreger der Aujeszky'schen Erkrankung bei Schweinen, und das Equine Herpesvirus 1 (EHV 1) bei Pferden.

(2) Betaherpesviren: Ein eingeschränkter Wirtsbereich und eine nur langsam ablaufende Virusreplikation kennzeichnen diese Gruppe von Herpesviren. Charakteristisch ist oft eine Vergrößerung der infizierten Zellen (Cytomegalie). In Zellkultur vermehren sich diese Viren ebenfalls nur sehr langsam. In latenter Form finden sich die Betaherpesviren vor allem in lymphoretikulären Zellen, sekretorischen Drüsen und anderen Geweben, wobei meist eine Immundefizienz zu Rezidiven mit ernsthaften Erkrankungen führt. Vertreter dieser Gruppe sind das humane und das murine Cytomegalievirus (HCMV, =humanes Herpesvirus 5, bzw. MCMV, =murines Herpesvirus 1).

(3) Gammaherpesviren: Diese Subfamilie wird auch als lymphotrope Herpesviren bezeichnet, da alle ihre Vertreter lymphoblastoide Zellen befallen. Die einzelnen Arten infizieren meist spezifisch B- oder T-Lymphozyten. Daneben können oft auch Epithelzellen und/oder Fibroblasten als Wirtszellen dienen (wenigstens in Kultur). Der Wirtsbereich ist beschränkt auf Spezies der gleichen Tierfamilie oder -ordnung. Latenz ist ebenfalls in lymphoiden Zellen bzw. Geweben zu beobachten. Hinzu kommt die Fähigkeit dieser Viren, proliferierende Erkrankungen - zumindest in geeigneten experimentellen Wirtstieren - zu erzeugen. Humanpathogener Vertreter dieser Gruppe ist das Epstein-Barr-Virus (EBV, =humanes Herpesvirus 4), außerdem gehören hierzu einige dem EBV ähnliche Herpesviren von Altwelt- und Neuweltaffen und daneben auch der Erreger der Marek'schen Geflügel lähmung bei Hühnern, das Marek's Disease Virus (MDV, =Hühnerherpesvirus 2). Ein weiteres beim Menschen vorkommendes Herpesvirus, das humane Herpesvirus 6 (HHV 6), wurde erst vor kurzem identifiziert und der alpha-Gruppe zugeordnet.

Bei den Herpesviren gibt es zwei Möglichkeiten der Wechselwirkung mit ihren jeweiligen Wirtsorganismen. Die erste Möglichkeit ist die klassische Virusvermehrung in den befallenen Zellen, die mit der Freisetzung neuer Viruspartikel und normalerweise auch mit der Zerstörung der Zellen endet, was zu den entsprechenden Krankheitsbildern der Erstinfektion führt, die das Virus hervorruft. Diese lytische Vermehrung läßt sich in den meisten Fällen mit permissiven Zellkulturen *in vitro* nachvollziehen. Gelingt dem infizierten Organismus aber eine immunologische Kontrolle über das eingedrungene Virus, so kann es in einen latenten Dauerzustand übergehen (siehe 3.), in dem es durch die Immunabwehr des Wirts nur schwer zu attackieren ist, und aus dem es dann bei bestimmten Gelegenheiten ausbrechen kann, um rekurrierende Infektionen, oftmals mit völlig neuen Krankheitssymptomen, zu verursachen. Zusätzlich zu diesen beiden Wegen können einzelne Herpesvirusarten, vor allem diejenigen aus der lymphotropen Gruppe, proliferierende Ekrankungen hervorrufen bzw. als Cofaktoren zu solchen beitragen (siehe 4.).

Der lytische Vermehrungszyklus verläuft bei allen bisher untersuchten Herpesviren in ähnlicher Weise, wenn auch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (ROIZMAN und BATTERSON 1985). Mit für die jeweilige Virusart spezifischen, membranständigen Strukturen kann das Herpesvirus sich an die passenden Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle anheften. Dann fusioniert die Virushülle mit der Zellmembran, wodurch das Viruskapsid in die Zelle gelangt und dort bis zum Zellkern transportiert wird. Die virale DNA wird in das Nucleoplasma entlassen, das leere Kapsid bleibt an den nukleären Poren zurück. Im Zellkern beginnt dann die Expression der viralen Gene (siehe 2.), die mit der Produktion neuer viraler Genome sowie der Proteinbestandteile des Kapsids endet. Leere Kapside formen sich in einem sogenannten "self assembly". Die zunächst vermutlich in zirkulären oder konkatemeren Molekülen replizierte genomische DNA wird geschnitten und in die Kapside verpackt. Anschließend werden die "reifen" Viruskapside bei der Ausknospung ("budding") durch die innere Kernmembran mit einer Hülle versehen und verlassen dann vermutlich über das endoplasmatische Retikulum bzw. den Golgi-Apparat oder in Verbindung mit einer Zellyse die Wirtszelle. Die Wirtszelle selbst wird normalerweise durch die Virusreplikation zerstört, vor allem wegen der vielfältigen Eingriffe viraler Faktoren in die Regulation des Zellstoffwechsels.

2. Genexpression und ihre Regulation:

Die Expression der viralen Gene, d.h. die Transkription in mRNAs, findet im Zellkern statt und wird von der zellulären RNA-Polymerase II durchgeführt. Eine Ausnahme hierzu bilden nur einige kleinere RNA-Spezies wie z.B. die EBERS beim Epstein-Barr-Virus, welche von der RNA-Polymerase III transkribiert werden (ROSA et al. 1981). Die Größe und Komplexität des Herpesvirusgenoms lassen bereits erkennen, daß besonders effiziente virale Regulationsmechanismen vorhanden sein müssen, um eine zeitlich geregelte und eine funktionell sinnvolle Abfolge der viralen Genexpression zu gewährleisten. Hinzu kommt ein regulativer Eingriff in den Zellstoffwechsel, d.h. es muß ein Zusammenspiel ablaufen, bei dem die Synthese zelleigener Produkte gebremst und die Synthese viraler Produkte forciert wird, so daß die Virusreplikation möglichst rasch und mit hoher Ausbeute abläuft, ohne daß jedoch das gesamte System vorzeitig zusammenbricht. Die Herpesviren sind für solche eine Regulation besser ausgerüstet als die meisten anderen Virusgruppen. Zu den obligatorischen Genen für die viralen Strukturproteine (Kapsid, Membranproteine) kommen Gene für eine Vielzahl von Enzymen der DNA-Replikation (eigene DNA-Polymerase bei allen Herpesviren, meist auch Thymidinkinase, Ribonukleotidreduktase, DNase sowie weitere DNA-bindende Proteine mit bisher noch nicht genau untersuchten Funktionen), Gene für Proteine mit regulatorischen (z.B. transaktivierenden) Eigenschaften und Gene für Faktoren, die auf die zelluläre Transkription und Translation einwirken.

Die Genexpression innerhalb des lytischen Zyklus ist am besten untersucht beim Herpes-Simplex-Virus. Die dort gefundenen Regulationsmuster haben sich im Grunde bei allen bis jetzt analysierten Herpesviren bestätigt. Allgemein wurde festgestellt, daß die Expression der viralen Gene in einem kaskadenartigen zeitlichen Ablauf erfolgt, es werden also nacheinander verschiedene Gruppen von Genen aktiviert und später wieder abgeschaltet (HONESS und ROIZMAN 1974). Man unterteilt in alpha-, beta- und gamma-Gene, auch unmittelbar frühe ("immediate early", IE), frühe ("early" oder "delayed early", DE) und späte ("late", L) Gene genannt. Nach dem Eintritt in den Zellkern werden zunächst nur die alpha-Gene transkribiert. Die immediate early mRNAs können in Zellkultur angereichert werden, indem man die Proteinsynthese mit Cycloheximid, Anisomycin oder ähnlichen Hemmstoffen ausschaltet. Unter den alpha-Genprodukten befinden sich ein oder mehrere transaktivierende Proteine, die die Gene der zweiten Stufe anschalten. Bei HSV hat man 5 immediate early Produkte gefunden (HONESS und ROIZMAN 1974), von denen bei einem (ICP4 = infected cell protein 4) eine

spezifische transaktivierende Wirkung auf bestimmte Promotoren anderer HSV-Gene nachgewiesen werden konnte, während ein zweites (ICP0) unspezifisch andere virale (auch heterologe), aber auch zelluläre Gene aktivieren kann (O'HARE und HAYWARD 1985a; O'HARE und HAYWARD 1985b; O'HARE et al. 1986). Für alle 5 alpha-Gene wurden zudem im Promotorbereich gemeinsame Zielsequenzen für einen Viruskapsidfaktor gefunden, der wiederum die Expression der Immediate early Gene stimuliert (CORDINGLEY et al. 1983; BATTERSON und ROIZMAN 1983; KRISTIE und ROIZMAN 1984). Ein ähnlicher Mechanismus wurde bei anderen Herpesviren gefunden bzw. postuliert, außerdem werden in manchen Fällen zelluläre Komponenten als Stimulatoren der Immediate early Genexpression diskutiert. Aber nicht nur Aktivierung, sondern auch Reprimierung wurde bei den frühesten Genprodukten gefunden. So hemmt das ICP4 die Transkription des eigenen Gens, aber nicht der anderen Immediate early Gene (O'HARE et al. 1986). Die Produktion der frühesten Genprodukte nimmt allgemein wieder ab, sobald spätere Proteine synthetisiert worden sind. In die Gruppe der beta-Gene gehören in erster Linie diejenigen von viralen Enzymen, die zur Replikation der viralen DNA notwendig sind. In der Zellkultur kann man die frühen Genprodukte anreichern, wenn man die viruspezifische DNA-Polymerase inhibiert, was z. B. mit Phosphonoessigsäure (phosphono acetic acid, PAA) und ähnlichen Verbindungen möglich ist (HONNESS und WATSON 1977). Erst wenn die DNA-Replikation in Gang gesetzt worden ist, beginnt die Expression der dritten Gengruppe, der gamma-Gene. Man unterscheidet hierbei noch zwischen gamma-1-Produkten, deren Gene auch ohne DNA-Replikation exprimiert werden, allerdings wesentlich schwächer, und gamma-2-Produkten, die nur entstehen, wenn neu synthetisierte virale Genome vorliegen.

3. Latenz:

Eine für Herpesviren besonders typische Eigenschaft ist die latente Infektion des Wirtsorganismus, gut untersucht ist dies vor allem bei den humanpathogenen Virusspezies (SUGDEN 1986). Sowohl HSV 1 und 2, VZV, CMV und EBV sind in der Lage, nach einer Primärinfektion mit oft nur wenig ausgeprägtem Krankheitsbild in eine Dauerform an bestimmten Orten im menschlichen Organismus überzuwechseln, von wo aus dann Rezidive entstehen können. Diese Erkrankungen durch Reaktivierung unterscheiden sich in den klinischen Symptomen und/oder in der Schwere der Erkrankung meist ganz erheblich von der Primärinfektion; bei VZV entstehen bei der Erstinfektion im Kindesalter die

Windpocken, während eine Reinfektion aus dem latenten Zustand zumeist erst beim erwachsenen Menschen zur äußerst schmerzhaften Gürtelrose führt, bei EBV entstehen aus der Latenz heraus Tumorerkrankungen wie Nasopharynxkarzinom und Lymphome.

Eine Ausprägung der Latenz sowie das Ausbrechen des Virus aus dem latenten Zustand geschieht stets im Zusammenspiel mit der Immunabwehr des Wirts. Das Herpesvirus entgeht einer völligen Vernichtung durch eine intakte Immunabwehr dadurch, daß es sich in Neuronen (HSV, VZV) oder Lymphoblasten (EBV) zurückzieht. Bei einer Schwächung des Immunsystems, wie sie z.B. im Zuge einer Organtransplantation durchgeführt wird oder aber infolge von AIDS entsteht, kann das Virus dann im Falle einer erneuten Freisetzung (bei HSV) bzw. von einer permanenten geringen Virusfreisetzung aus (bei EBV) nicht mehr unter Kontrolle gebracht werden und kann zu massiven virusbedingten Läsionen führen. Während der Latenz wird das komplette virale Genom in den betroffenen Zellen konserviert und repliziert, so daß bei Verlassen des latenten Zustands eine produktive Virusreplikation wie bei der Erstinfektion ablaufen kann. Dagegen sieht die Struktur der Virus-DNA bei der Latenz anders aus, das Genom liegt jetzt in episomaler Form vor oder ist in das Wirtszellgenom integriert, während es im lytischen Vermehrungszyklus ein lineares Molekül darstellt. Außerdem ist die Genexpression im Vergleich zum lytischen Zyklus stark eingeschränkt: Bei HSV scheint es nach den neuesten Befunden so zu sein, daß nur ein relativ kurzer Genomabschnitt transkribiert wird, wobei unter anderem eine "antisense"-RNA zu einem immediate early Gen entsteht (SPIVACK und FRASER 1987; STEVENS et al. 1987). Bei EBV ist ein bestimmter Set von latenten Genprodukten vorhanden (BAICHWAL und SUGDEN 1988), wobei das nukleäre Antigen 1 (EBNA1) zur Replikation der viralen DNA benötigt wird (REISMAN und SUGDEN 1986), während die Rolle der übrigen Produkte noch nicht geklärt ist (siehe auch 4.). Generell scheint bei der Latenz eine Repression von viralen Genen unter Beteiligung von zellulären Faktoren stattzufinden. Wie die Aufhebung dieser repressiven Mechanismen auf molekularer Ebene vonstatten geht, ist nur in Ansätzen geklärt. Bei HSV kommt als erster Schritt eine Reaktivierung von ICP4 in Betracht, bei EBV hat man vor kurzem ein virusspezifisches Protein, das Produkt des BZLF1 genannten Leserahmens, als transaktivierenden Faktor bei der Überwindung des latenten Status identifiziert (COUNTRYMAN und MILLER 1985; MARSCHALL et al. 1988). Möglicherweise sind auch hier wieder zelluläre Faktoren involviert, die eine für das Virus vorteilhafte Situation innerhalb oder außerhalb der Zelle umsetzen in eine Aktivierung von frühen regulatorischen Genen des Virus. Hinweise für eine Expression in Abhängigkeit vom

Differenzierungsstatus wurden bei EBV-infizierten Zellen in oralen Haarzell-Leukoplakien gefunden (BECKER et al. 1988).

In vitro ist die latente Infektion nur bedingt nachzuvollziehen, da die immunologischen Gegebenheiten bei einer Kultivierung der latent infizierten Zelle nicht oder nur partiell simuliert werden können. So gehen z.B. alle HSV-befallenen Neurone in vitro spontan zur Virusreplikation über. EBV-transformierte Lymphozyten dagegen sind ein besseres Modell, bei ihnen verfällt ein konstanter, aber relativ geringer Prozentsatz in den lytischen Zyklus.

4. Transformation und Oncogenität:

Herpesviren zählen neben Papillomviren, Adenoviren, Polyomaviren und Hepadnaviren zu den oncogenen DNA-Viren (GREEN 1985). Dabei ergibt sich jedoch kein einheitliches Bild: Während das humane EBV mit zwei menschlichen Tumorerkrankungen als kausaler Faktor oder zumindest als Cofaktor assoziiert ist, ebenso wie MDV bei Hühnern und das Lucké-Virus bei Fröschen proliferierende Erkrankungen hervorrufen, hat man bei anderen Herpesviren keine Tumorentstehung im natürlichen Wirt schlüssig nachweisen können. Zum Teil können aber in experimentellen Wirtstieren Tumorerkrankungen erzeugt werden (bei gamma-Herpesviren) bzw. man kann in vitro geeignete Zellen transformieren (HSV, CMV). Diese Fähigkeit vieler Herpesviren zur Transformation von Zellen läßt vermuten, daß sie als Cofaktoren bei der Krebsentstehung auch in anderen als den 3 genannten Fällen eine Rolle spielen könnten.

Die molekularbiologischen Grundlagen dieser viralen Transformation liegen noch weitgehend im Dunkeln. Das komplexe Genom der Herpesviren erschwert eine Suche nach den beteiligten viralen Genen und Faktoren, zudem weisen die bisher vorliegenden Daten auf verschiedenartige Mechanismen bei den verschiedenen Spezies hin. Betrachtet man etwa HSV 1 und 2 sowie HCMV, so findet man, daß diese Viren mehrere Arten von Zellen transformieren können, daß aber die dabei entstehenden Zelllinien in späteren Passagen frei von jeglicher viraler DNA sind (ALBRECHT und RAPP 1973; CAMACHO und SPEAR 1978; KNIPE 1982). Die zur Transformation benötigten viralen Genomanteile konnten auf 1 oder 2 kurze Sequenzen in den jeweiligen Virusarten eingegrenzt werden, wobei untereinander keine (HSV 1 und 2) oder nur geringe Homologien (HSV 2 und CMV) zu beobachten sind (HAYWARD und REYES 1983; CLANTON et al. 1983; JARIWALLA et al. 1983). Die entsprechenden Genomstücke enthalten außerdem keine vollständigen Leserahmen für Proteine. Dagegen konnte bei dem 700 bp langen

transformierenden DNA-Fragment von HSV 2 eine stem-and-loop-Struktur identifiziert werden, wie sie auch bei Insertionselementen vorkommt. Man hat ausgehend von diesen Beobachtungen einen sogenannten hit-and-run-Mechanismus postuliert, d.h. diese Viren sind anscheinend in der Lage, mit Hilfe von speziellen, relativ kurzen Genomabschnitten eine Transformation ihrer Wirtszellen zu verursachen, für die Aufrechterhaltung des transformierten Zustands werden sie aber nicht mehr benötigt (GALLOWAY und McDUGALL 1983). Möglicherweise läuft diese Art der Immortalisierung über eine Aktivierung von zelleigenen Protooncogenen, wie sie auch von den LTR-Sequenzen (large terminal repeats) der Retroviren verursacht werden kann. Bei einem anderen alpha-Herpesvirus, dem EHV 1 scheint im Gegensatz zu den eben genannten Viren ein Stück des viralen Genoms für die Aufrechterhaltung des transformierten Status gebraucht zu werden. Mit EHV 1 transformierte Zellen enthalten diese viralen Sequenzen in integrierter Form auch nach über 100 Passagen (ROBINSON und O'CALLAGHAN 1983). Auf welche Weise EHV 1 Zellen immortalisiert, ist jedoch noch nicht bekannt.

Ein anderes Bild ergibt sich für die lyphotropen gamma-Herpesviren, bei denen sowohl Tumore in experimentellen Wirtstieren hervorgerufen werden können, als auch eine in vitro Immortalisierung bzw. Transformation von B- oder T-Lymphozyten möglich ist (DEINHARDT und DEINHARDT 1979; EPSTEIN und ACHONG 1986). Am Beispiel des EBV soll kurz gezeigt werden, daß vor allem letzteres einige Erkenntnisse in Richtung auf die molekularen Grundlagen der Oncogenität gebracht hat, wenn auch das Gesamtbild bei weitem nicht vollständig ist (KNUTSON und SUGDEN 1988). EBV immortalisiert menschliche periphere B-Lymphozyten in vivo ebenso wie in vitro. Diese Immortalisierung ist im Gegensatz zu HSV gleichbedeutend mit der latenten Infektion, EBV ist also zur Aktivierung wie zur Aufrechterhaltung des transformierten Zustands der Zellen notwendig. Das EBV-Genom liegt stets als Episom in allen Zellen vor, wobei nur eine begrenzte Zahl von viralen Genen exprimiert wird. Welche Rolle diese Genprodukte bei der Immortalisierung spielen, ist bislang nur in Ansätzen erkennbar (KNUTSON und SUGDEN 1988). Aufgrund von Deletionen in transformationskompetenten EBV-Stämmen weiß man, daß wenigstens 20% des Virusgenoms hierfür nicht gebraucht werden, mit Hilfe eines frame-shift-Mutagens hat man geschätzt, daß zwischen 15 und 25% des Genoms ausreichen könnten für eine Immortalisierung (MARK und SUGDEN 1982). Dies ist aber noch umstritten, da die Transkription für verschiedene virale Proteine in den transformierten Zellen größere Bereiche des Genoms umfaßt.

Von den acht bisher identifizierten EBV-Genprodukten in den transformierten Zelllinien konnten erst 3 funktionell mit dem immortalisierungsvorgang korreliert werden (KNUTSON und SUGDEN 1988). Zum einen ist es das schon erwähnte EBNA 1, das die Replikation des latenten EBV-Genoms steuert und außerdem über eine enhancer-Sequenz die eigene Transkription sowie die Expression von wenigstens 2 anderen latenten Genprodukten aktiviert. Die Bedeutung eines weiteren nukleären Proteins, des EBNA 2, für die Transformation wird schon aus der Tatsache ersichtlich, daß das zugehörige Gen in dem nicht transformierenden Stamm P3HR1 teilweise deletiert ist. EBNA 2 führt in den Lymphozyten unter anderem zu einer gestelgerten Expression des CD23-Oberflächen-Antigens, das als IgE-Rezeptor fungiert (YUKAWA et al. 1987), und von dem ein proteolytisches Spaltprodukt als Wachstumsfaktor für periphere Lymphozyten wirken kann (WANG et al. 1987). Ein drittes latentes EBV-Protein, das mit der Transformation in kausalem Zusammenhang gesehen wird, ist das LMP (latent membrane protein), welches in klonierter Form Rat-1-Zellen transformieren kann (WANG et al. 1985). Von seiner Struktur her als Membranprotein könnte es die Rolle eines Rezeptors für Wachstumsfaktoren spielen, was allerdings experimentell noch nicht gezeigt ist. Eine Rolle in diesem komplexen Mechanismus der Immortalisierung scheint auch den sogenannten EBERs zuzukommen, 2 kleinen RNA-Spezies, die von der RNA-Polymerase III transkribiert werden und zwar besonders stark in den transformierten Zelllinien (ROSA et al. 1981; ARRAND und RYMO 1982). Sie sind nach den jetzigen Erkenntnissen, vor allem durch Vergleich mit ähnlichen RNAs der Adenoviren, möglicherweise beteiligt an der Translation in den EBV-tragenden Zellen oder aber am Prozessieren von Transkripten in Ribonucleoprotein-Partikeln des Zellkerns (GLICKMAN et al. 1988).

Insgesamt gesehen hat man damit bislang nur einzelne Mosaiksteine des gesamten Mechanismus, mit dem EBV Zellen zu permanent wachsenden Zelllinien verändern kann. Noch schwieriger ist es, die Rolle von EBV bei der Entstehung der mit ihm korrelierten Tumorerkrankungen herauszufinden. Beim Nasopharynxkarzinom (NPC), das in Südostasien besonders stark verbreitet ist, findet man in den betroffenen Epithelzellen stets EBV-Genome und -Genprodukte, der kausale Zusammenhang zwischen EBV und Tumorentstehung ist dagegen weitgehend unbekannt. Eine in vitro Transformation von epitheloiden Zellen ist bisher nur durch Transfektion einzelner klonierter EBV-Genomabschnitte oder durch Infektion von EBV unter gleichzeitiger Behandlung mit Phorbolester gelungen (GRIFFIN und KARRAN 1984; TOMEI et al. 1987). Bei dem afrikanischen Burkitt-Lymphom und bei ähnlichen EBV-haltigen Lymphomen in Patienten mit Immunsuppression scheinen die (zeitweilige) Schwächung der

zellgebundenen Immunabwehr und eine damit einhergehende verstärkte Proliferation von B-Lymphozyten, beides etwa bedingt durch Malaria, als Auslöser dafür zu dienen, daß die EBV-transformierten bzw. latent infizierten Lymphozyten der normalen Kontrolle entkommen und zum Lymphom auswachsen können (WHITTLE et al. 1984; LENOIR und BORNKAMM 1986). Das Tumorstadium selbst kann danach auch bei intakter T-Zell-gebundener Immunabwehr fortschreiten, das bedeutet, die EBV-enhaltenden Tumorzellen sind an ihrer Oberfläche so verändert, daß sie nicht mehr als solche erkannt werden können (ROONEY et al. 1985). Die kausale Beteiligung von spezifischen Chromosomen-Translokationen und einer damit einhergehenden Überexpression des zellulären c-myc-Protooncogens, wie sie in allen Burkitt-Lymphomen beobachtet werden (KLEIN 1983), bleibt weiterhin ein zu klärender Punkt in der EBV-korrelierten Tumorgenese.

5. Herpesvirus salmieri (=salmirines Herpesvirus 2):

Die bei Primaten vorkommenden lymphotropen Herpesviren lassen sich in zwei Kategorien einteilen: Das humane EBV sowie verwandte Viren bei Altweltaffen (Herpesvirus pan, Herpesvirus papio u.a.) befallen B-Lymphozyten in vivo und in vitro, Zielzellen von Herpesvirus salmieri, Herpesvirus ateles und Herpesvirus aotus Typ 2, deren Wirtstiere Affenarten in Südamerika sind, sind dagegen T-Lymphozyten. Beide Gruppen von Viren zeigen in ihrer Biologie und nach neuesten Untersuchungen auf molekularer Ebene große Ähnlichkeiten.

Der natürliche Wirt für Herpesvirus salmieri (HVS) ist das südamerikanische Totenkopffäffchen (*Salmirolus scureus*). Isoliert wurde das Virus erstmals 1968 aus primären Nierenzellkulturen dieser Tiere (MELENDEZ et al. 1968). Es ist in allen Populationen dieser Affenspezies verbreitet, ohne daß man bis heute Krankheitssymptome gefunden hat, die einer Primärinfektion durch HVS zuzuschreiben wären (FALK 1980). Experimentelle Infektion von verwandten Affenarten führt dagegen zur Entstehung von malignen Tumoren des lymphatischen Systems. Gleiche biologische Eigenschaften hat ein zweites, mit dem HVS nahe verwandtes Virus, das Herpesvirus ateles (HVA), dessen natürliche Wirtstiere Krallenaffen der Gattung *Ateles* sind (MELENDEZ et al. 1972). Die Ähnlichkeit zwischen beiden Virusarten wird durch gleichartigen Genomaufbau, immunologische Kreuzreaktionen sowie eine begrenzte Kreuzhybridisierung zwischen ihren Genomen dokumentiert (FLECKENSTEIN et al. 1978b; FLECKENSTEIN und DESROSIERS 1982).

Herpesvirus saimiri wird innerhalb einer Affenpopulation horizontal weitergegeben von den älteren auf die jüngeren Tiere. Dies geschieht über den Speichel oder über Aerosole (DEINHARDT et al. 1973). Ebenso wie bei EBV wird HVS nach der Erstinfektion längere Zeit, meist sogar lebenslang, über den Speichel ausgeschieden (FALK et al. 1973b). Etwa im Alter von 2 Jahren sind alle Tiere mit dem Virus infiziert, was sich durch Serokonversion nachweisen läßt (FALK et al. 1973a). Der Ort der Primärinfektion im Wirtstier und zugleich der Ort, von dem die Virussekretion ausgeht, ist bislang noch nicht bekannt. Es folgt eine latente Infektion von T-Lymphozyten, aus denen HVS durch Kokultivierung mit permissiven Zellkulturen isoliert werden kann. B-Lymphozyten sind mit HVS nicht zu infizieren (WRIGHT et al. 1976), das bedeutet, ihnen fehlt der bis jetzt nicht identifizierte Rezeptor für das Virus. Ähnlich spezifisch, allerdings für B-Lymphozyten, ist das EBV, jedoch hat man hier keine Epithelzelllinie, die sich mit EBV infizieren läßt. Für HVS stehen solche Zelllinien, zumeist Affennierenzellen, zur Verfügung, was die Kultivierung des Virus und die Untersuchung seines lytischen Vermehrungszyklus wesentlich erleichtert. Bevorzugt werden heute OMK-Zellen (owl monkey kidney), d. h. Nierenepithelzellen von Nachtaffen (*Aotus trivirgatus*) verwendet (DANIEL et al. 1976). Inwieweit epitheloide Zellen im Wirtstier Orte für Primärinfektion und/oder Latenz von HVS darstellen, ist noch nicht geklärt.

Die humorale Immunantwort im Verlauf der Infektion mit Herpesvirus saimiri wurde von G. Klein und Mitarbeitern beschrieben anhand von experimentell infizierten jungen Totenkopffaffen (KLEIN et al. 1973). Die Tiere entwickeln Antikörper gegen Viruskapsidantigene (VCA) und frühe Antigene (EA) bereits nach 2 - 3 Wochen. Während die Antikörper gegen EA nach 2 Monaten einen Gipfel erreichen und danach bis unter die Nachweisgrenze absinken, steigen die Antikörper gegen die späten Antigene (LA) nach 1 - 3 Monaten auf einen Spitzenwert an und fallen langsam ab bis auf einen meist lebenslang gleichbleibenden Mittelwert. Dieses Antikörperprofil findet sich auch beim EBV-infizierten Menschen. Ein dem nukleären Antigen von EBV (EBNA) vergleichbares Antigen wurde bei HVS nicht gefunden.

Morphologisch weist Herpesvirus saimiri die für Herpesviren typischen Strukturen auf mit einem das Genom enthaltenden Kapsid in Ikosaederform, das umgeben wird von einer Hüllmembran, in die virusspezifische Membranproteine eingelagert sind. Das gesamte Viruspartikel hat einen Durchmesser von ca. 150 nm.

In der Klassifikation der herpesviralen Genomstrukturen (Abb. 1) repräsentieren die 3 genannten lymphotropen Viren von Neuweltaffen einen eigenständigen Typus.

Das Genom von Herpesvirus saimiri ist eine lineare doppelsträngige DNA, die ca 150 kbp lang ist und in 2 deutlich voneinander abgesetzte Bereiche unterteilt ist (FLECKENSTEIN und WOLF 1974; FLECKENSTEIN und BORNKAMM 1975). Der größere Teil ist eine 112 kbp lange Sequenz ohne sich wiederholende Einheiten (repeats), die einen auffällig niedrigen GC-Gehalt von 36% aufweist und daher als L-DNA (L = low) bezeichnet wird. Links und rechts von diesem Bereich befinden sich Sequenzen mit einem enorm hohen GC-Anteil von 71%, die zusammengenommen etwa 30% des viralen Genoms ausmachen. Diese sogenannte H-DNA (H = high) besteht aus Tandem-repeats eines 1.4 kbp großen DNA-Stückes, welche in relativ konstanter Zahl (36) vorhanden sind, sich aber stets ungleichmäßig an den beiden Enden der L-DNA gleichgerichtet verteilen (BORNKAMM et al. 1976). Die H-DNA wird nicht transkribiert (TRACY u. DESROSIERS, 1980), in ihrer Sequenz finden sich auch keine längeren Leserahmen (BANKIER et al. 1985), vermutlich spielt dieser Genombereich nur bei der Replikation und/oder der Verpackung des Genoms in das Kapsid eine Rolle. Neben dieser infektiösen Virus-DNA, auch M-DNA genannt wegen des mittleren GC-Gehalts von 46%, entstehen bei der lytischen Vermehrung in den Zellen Genome, die nur aus H-DNA zusammengesetzt sind (FLECKENSTEIN und WOLF 1974). Sie machen etwa 10% der DNA-Produktion aus und sind nicht infektiös. Das M-Genom hingegen erweist sich auch bei einer Transfektion losgelöst vom Viruspartikel als infektiöses Agens und führt zur Produktion von vollständigen Virionen (FLECKENSTEIN et al. 1975).

Eine größere Anzahl von HVS-Stämmen hat man mittlerweile isoliert, wobei alle die gleiche DNA-Struktur besitzen und nach Kreuzhybridisierungsexperimenten eine hohe Sequenzhomologie aufweisen (DESROSIERS und FALK 1982; FLECKENSTEIN und DESROSIERS 1982). Unterscheiden kann man diese Stämme aufgrund der Schnittstellenmuster von diversen Restriktionsendonucleasen. Es hat sich herausgestellt, daß am linken Rand der L-DNA eine Region von etwa 7 kbp relativ stark variiert (MEDVECZKY et al. 1984), ein Bereich, der in bezug auf Oncogenität von Bedeutung ist (s. u.). Ebenso variiert die H-DNA stärker als der Hauptteil des Genoms (KEIL et al. 1980); sie kann wahrscheinlich, da sie nicht für Proteine kodiert, größeren Veränderungen unterliegen, ohne daß dies sich nachteilig auf die Virusvermehrung auswirkt. Diese Variabilität kann sich innerhalb einer geschlossenen Population ausbilden, in 2 Fällen hat man sogar Veränderungen im selben Tier innerhalb von etwa 2 Jahren feststellen können (DESROSIERS und FALK 1982).

Der Ablauf der Genexpression im lytischen Vermehrungszyklus von Herpesvirus saimiri entspricht etwa dem vom Herpes-simplex-Virus bekannten Muster.

Untersuchungen hierzu wurden vor allem über eine Analyse der Proteinsynthese durch in vivo Markierungsexperimente in HVS-infizierten OMK-Zellen durchgeführt. Bei einer Infektion mit 1 PFU(plaque forming unit)/Zelle dauert es 2 - 3 Tage, bis alle Zellen eine Infektion durchlaufen haben, was durch die völlige Zerstörung des Zellrasens sichtbar wird. Mehr als 30 verschiedene virusspezifische Proteine wurden identifiziert, welche in unterschiedlichen Phasen der Infektion produziert werden (MODROW und WOLF 1983a; RANDALL et al. 1983). Die Unterdrückung der Synthese zellulärer Produkte läuft bei HVS langsamer ab als bei HSV. Zudem kann die virale Infektion der Zellen nicht vollständig synchronisiert werden (RANDALL et al. 1985). Beides erschwert eine Unterscheidung zwischen frühen und späten Proteinen. Mit Hilfe von PAA sowie Aminosäureanalogen wie Canavanin (für Arginin) und Azetidin (für Prolin) konnten etwa 10 frühe Proteine angereichert werden (MODROW 1983; O'HARE und HONESS 1983). Die meisten von ca 20 strukturellen Proteinen entstehen erst in der späten Phase des Infektionszyklus, sie konnten identifiziert werden durch einen Aufschluß von gereinigten in vivo markierten Viruspartikeln (MODROW und WOLF 1983b; KEIL et al. 1983). Einige der virusspezifischen Proteine werden in den Zellen modifiziert. Neben einer Phosphorylierung von verschiedenen Polypeptiden (frühe und enzymatisch wirksame in erster Linie) wurde Glykosylierung vor allem bei einigen Strukturproteinen (Membranproteine u. a.) gefunden (MODROW 1983). Um die viralen Produkte vor dem zellulären Background besser zu sehen, wurden HVS-spezifische Seren eingesetzt, die von infizierten Affen oder aber durch Injektion gereinigter Viruspartikel in Kaninchen gewonnen wurden (MODROW et al. 1983). Eine weitere Verbesserung brachte die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen HVS-Proteine (RANDALL et al. 1984; DAHLBERG et al. 1985).

Im Gegensatz zu dem recht ausführlichen Bild der Genexpression von Herpesvirus salmieri auf Proteinebene waren zu Beginn dieser Arbeit keine Daten über die transkriptionelle Ebene vorhanden. Des weiteren konnte zwar eine grobe Unterteilung in frühe und späte Proteine vorgenommen werden, die allerersten Genprodukte, zu denen auch regulatorische gehören müssen, waren noch nicht analysiert und sind Gegenstand dieser Arbeit.

In seinen natürlichen Wirtstieren scheint Herpesvirus salmieri bei Primärinfektion keine Erkrankung hervorzurufen, auch eine Tumorinduktion wurde bislang nicht beschrieben. Letzteres könnte jedoch dadurch zu erklären sein, daß ein solcher Tumor ähnlich selten auftritt wie die EBV-korrelierten NPC und Burkitt-Lymphome in Europa und Amerika, und die Zahl der beobachteten

Tierpopulationen zu gering gewesen ist, um das Auftreten eines Tumors entdecken zu können. In einigen verwandten Affenarten kann man hingegen durch experimentelle Infektion mit HVS Neoplasien im lymphatischen System erzeugen (MELENDEZ et al 1969; FALK 1980). Am besten geeignet sind Krallenaffen der Gattung *Saguinus*, wie z. B. Lisztäffchen (*S. oedipus*), Weißlippenäffchen (*S. fuscicollis*, *S. nigricollis*) und Weißschnurrbartäffchen (*S. mystax*). Alle diese Affenarten entwickeln bei Infektion mit HVS eine rasch fortschreitende lymphoproliferative Erkrankung, die in jedem Fall mit dem Tod dieser Tiere endet, wobei die Zeitspanne abhängig von Virusdosis und Tierspezies ist. Bei *S. oedipus* dauert es 4 - 7 Wochen, bis die Tiere sterben, bei den anderen bis zu 16 Wochen. Die ersten Anzeichen der Tumorerkrankung bei *S. oedipus* sind Hepatosplenomegalie und generalisierte Lymphknotenvergrößerungen nach etwa 10 Tagen. In späteren Phasen zeigen sich starke Veränderungen, d. h. Vergrößerungen, hämorrhagische Bereiche usw., in allen Organen des lymphatischen Systems (Milz, Thymus, Lymphknoten) und in parenchymatösen Organen wie Leber, Nieren und Nebennieren (HUNT et al. 1970). Mikroskopisch werden Infiltrationen dieser Organe und Gewebe mit lymphoretikulären Zellen erkennbar (KING und MELENDEZ 1972). Läsionen können auch im Knochenmark und anderswo auftreten. Hinzu kommt häufig eine Leukämie, hervorgerufen durch Vermehrung von Polymorphozyten, Lymphoblasten und Retikulum-Zellen. Generell lassen sich alle diese neoplastischen Erkrankungen der HVS-infizierten Tiere als malignes Lymphom des Retikulumzelltyps bzw. des schwach differenzierten Lymphozytentyps bezeichnen (HUNT et al. 1970). Auffallend im Vergleich zu anderen Lymphomen ist die starke Nekrose einzelner Organe, verbunden mit einem extrem raschen Erkrankungsverlauf. Bei anderen *Saguinus*-arten verläuft die Tumorentwicklung mit ähnlichen Symptomen bzw. pathologischem Erscheinungsbild wie bei *S. oedipus*.

Auch in den nahe verwandten Weißbüscheläffchen (*Callithrix jacchus*) können durch Herpesvirus salmieri Tumore erzeugt werden, allerdings ist die Reaktion hier nicht einheitlich. Während mit HVS-Stamm S295C nur in einem Teil der Tiere eine Tumorerkrankung beobachtet werden konnte (LAUFS und FLECKENSTEIN 1973; ABLASHI et al. 1978), waren die beiden Stämme 11 und OMI immer oncogen (WRIGHT et al. 1977). Die entstandenen Lymphome sahen ebenso aus wie bei den Krallenaffen. Infizierte Tiere, die keine Tumore entwickelten, zeigten eine Antikörperantwort, wie sie bei den infizierten Totenkopffäffchen gefunden wird, d. h. mit dem beschriebenen Profil der Antikörper gegen EA und LA (LAUFS und FLECKENSTEIN 1973).

Eine weitere Affenart, bei der ebenfalls mit unterschiedlichem Erfolg Tumore durch Inokulation mit HVS hervorgerufen werden konnten, sind Nachtaffen (*Aotus trivirgatus*), die Tumorentwicklung verläuft dabei über einige Wochen oder sogar Monate bis zum Tod der Tiere (MELENDEZ et al. 1969; HUNT et al. 1970; MELENDEZ et al. 1971). Die pathologischen Erscheinungen sind wiederum ähnlich denen der genannten Fälle, nur die Zerstörung der parenchymatösen Organe ist etwas weniger ausgeprägt. Bei 75% der Tiere entwickelt sich eine Leukämie in der Spätphase. Andere Arten, die HVS-Induzierte Neoplasien entwickelten, sind Kapuzineraffen (*Cebus albifrons*), Klammeraffen (*Ateles geoffroyi*) und Brüllaffen (*Alouatta caraya*). Dagegen ist es im allgemeinen nicht möglich, Altweltaffen mit HVS zu infizieren. Nur ein Fall einer HVS-induzierten Tumorerkrankung in der Afrikanischen Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) wurde berichtet (MELENDEZ et al. 1970), alle anderen bisherigen Versuche mit Grünen Meerkatzen, Pavianen und Schimpansen waren negativ. Ebenso ist auch kein Fall einer auf HVS beruhenden Erkrankung beim Menschen bekannt geworden, obwohl bei Zoo- und Laborpersonal, Tierhändlern usw. Möglichkeiten der Infektion, etwa durch Affenbisse, gegeben sind.

Eine weitere Tierspezies außerhalb der Primaten, bei der die oncogene Wirkung von HVS nachgewiesen wurde, sind Kaninchen. Bei zwei Inzuchtstämmen von New Zealand White Rabbits (ACCRB und III/J) kommt es nach Inokulation von HVS in 20 bis 75% der Fälle zu Tumorerkrankungen ähnlich denen bei den Neuweltaffen (DANIEL et al. 1974; RANGAN et al. 1976). Dabei ist die massive Infiltration von Organen und Geweben, sogar der Augen und des Gehirns, mit Lymphozyten und Lymphoblasten charakteristisch (HUNT et al. 1975). Medveczky und Mitarbeiter konnten zeigen, daß HVS-Isolate nach ihren biologischen Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt werden können. Für die Vertreter von zwei dieser Gruppen wurde regelmäßig eine Transformation bei Infektion von Kaninchen nachgewiesen (MEDVECZKY et al. 1988).

Auch wenn man durch diese Tiermodelle mehrere Möglichkeiten hat, die Tumorinduktion durch Herpesvirus salmuri sowie den Verlauf dieser Erkrankungen mit allen makroskopischen und mikroskopischen Erscheinungen zu beobachten, so bleiben die molekularvirologischen Mechanismen weiter rätselhaft. Zunächst ist die Frage, ob in den Inokulierten Tieren eine Virusvermehrung in Gang gesetzt wird, und wo diese stattfinden könnte. Tumortragende Tiere scheiden keine Viruspartikel aus wie die Totenkopffäffchen, das Virus kann nicht aus dem Speichel oder aus dem Serum isoliert werden. Andererseits läßt die Tatsache, daß die Tumorinduktion meist überaus rasch und aggressiv verläuft, selbst wenn sie von einer geringen Virusinokulation ausgeht (ABLASHI et al. 1973), vermuten, daß

eine produktive Replikation eingeschaltet sein muß. So kann bereits ein latent infiziertes Totenkopffäffchen durch engen Käfigkontakt mit einem Krallenaffen oder Nachtaffen diesen infizieren, so daß es zur Tumorentwicklung kommt (HUNT et al. 1973). Ebenso weist die humorale Immunantwort auf eine Virusproduktion in den Tieren mit Lymphomentwicklung hin. Diese Antikörperbildung stellt sich auch ein, wenn den Tieren kein komplettes Virus, sondern nur infektiöse DNA inokuliert wurde, die für die oncogene Wirkung bereits ausreicht (FLECKENSTEIN et al. 1978). Man kann also davon ausgehen, daß in den tumorentwickelnden Tieren von bestimmten Orten aus, vermutlich T-Lymphozyten, eine vorübergehende oder permanente Virusausbreitung stattfindet, die dann erst die überaus schnelle Lymphoproliferation durch ständige Neutransformation von Lymphozyten verursacht. Nur in den Kaninchen deutet vieles, unter anderem die ausbleibende oder wesentlich schwächere Immunantwort (DANIEL et al. 1974) darauf hin, daß das ursprüngliche Inokulum zur Ausblildung des malignen Lymphoms alleine verantwortllich ist.

In allen Fällen sind die T-Lymphozyten als einziges direkt von den oncogenen Vorgängen betroffen (WRIGHT et al. 1976). Die entstandenen Lymphome sind polyklonal. Dies mag eine weitere Erklärung für den raschen Verlauf der Tumorentwicklung sein, denn mit den T-Zellen ist gerade die zellgebundene Immunabwehr ausgeschaltet, die im gesunden Organismus für die Bekämpfung entarteter Zellen zuständig ist. Im Vergleich dazu ist die Entwicklung von EBV-induzierten Lymphomen wesentlich langsamer, da hier B-Lymphozyten monoklonal proliferieren, und die Schwächung der zellgebundenen Immunabwehr von außerhalb kommen muß. Hinzu kommt, daß bei EBV lange nach einer Primärinfektion latente B-Lymphozyten zu Tumoren auswachsen, während bei HVS vermutlich eine massive Neuproduktion von Viruspartikeln zwischengeschaltet ist. HVS (ebenso wie HVA) als Modellsystem für EBV erfährt hierdurch also eine gewisse Einschränkung. Vergleichbar hingegen ist das Vorhandensein von viraler DNA in allen tumorösen Organen bei HVS-infizierten Krallenaffen u. a., meist liegt eine Vielzahl von Genomen pro Zelle vor (FLECKENSTEIN et al. 1977).

Virale Genexpression in den Tumorgeweben konnte bis jetzt nicht gemessen werden, weder virale mRNAs noch Proteine oder gar Virionen wurden entdeckt. Dies könnte durch eine weitgehende Repression der lytischen Vermehrung begründet sein. Isoliert man Zellen aus dem Tumorverband, so gewinnen sie erst nach und nach wieder die Fähigkeit, Virus zu produzieren. Von Transplantationen her hat man allerdings Hinweise, daß es doch zur Virusproduktion in den Tumoren kommen könnte: Transplantiertes Tumorgewebe erzeugte in den nicht infizierten Empfängern wieder eine HVS-spezifische Tumorentwicklung (MARCZYNSKA et al.

1973), was eigentlich nur über die vorhergehende Produktion von Viruspartikeln geschehen konnte.

Nicht erklärt werden kann bis jetzt, warum bei einigen virusinfizierten Affenarten mehrere Tiere im Gegensatz zu den Artgenossen keine Tumore entwickeln und statt dessen einen Virusträgerstatus wie bei den Totenkopffäffchen erreichen (LAUFS und FLECKENSTEIN 1973; LAUFS et al. 1974). Möglicherweise gibt es eine immunologische Schwelle, die von dem eindringenden Virus überwunden werden muß, um zum Tumor zu führen. Gelingt dies nicht, so läuft die Infektion in eine andere Richtung, nämlich in den Zustand der latenten Infektion mit dauerhafter Kontrolle des Wirtsorganismus über das Virus. Dies würde bedeuten, daß sich der natürliche Wirt, das Totenkopffäffchen, im Lauf der Evolution so gut auf das Virus eingestellt hat, daß dieser Schwellenwert für HVS besonders schwer oder überhaupt nicht zu erreichen ist. Dagegen wäre den anderen Affenarten eine solche Anpassung nicht oder nur bedingt möglich gewesen, da die Infektion mit HVS in der Natur für sie kaum in Frage kommt. Umgekehrt könnte man dies als vorteilhafte Anpassung des Virus deuten, denn die latente Infektion sichert ihm unbegrenzte Ausbreitungsmöglichkeiten, wohingegen die Tumorentwicklung mit dem Tod der Wirtstiere eine Sackgasse darstellt.

Eine besondere Variante von Herpesvirus salmieri bilden die attenuierten Stämme. In zwei Arbeiten wurden durch Passagieren des Virus in Vero-Zellen (Nierenepithelzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze) bei 39°C bzw. durch eine persistente Infektion einer Vero-Zellkultur Varianten aus den Wildtypstämmen 11 und SMHI erhalten, 11att und SMHIatt genannt, die keine oncogene Wirkung mehr entfalten können (SCHAFFER et al. 1975; FALK et al. 1980). Statt dessen kommt es wiederum zur latenten Infektion ohne Krankheitsbild, die zudem in den meisten Fällen einen Schutz bildet gegen eine zweite Infektion mit dem oncogenen Wildtypvirus (WRIGHT et al. 1977; WRIGHT et al. 1980). Eine Untersuchung der Virusgenome bei beiden attenuierten Stämmen hat ergeben, daß jeweils ein Stück am linken Ende der L-DNA (1.1 MDa bei 11att, 3.5 MDa bei SMHIatt) deletiert ist (KOOMEY et al. 1984). Diese Region ist, wie schon erwähnt, in bezug auf Restriktionsschnittstellen bei den verschiedenen Virusstämmen sehr variabel. Man konnte die vielen isolierten HVS-Stämme hinsichtlich gemeinsamer Muster bei diesen Schnittstellen in 3 Gruppen einteilen (MEDVECZKY et al. 1984). Die Arbeitsgruppe von R. Desrosiers hat diesen Genombereich näher untersucht, indem verschiedene zusätzliche Deletionsmutanten durch Rekombination konstruiert und in Krallenaffen sowie durch in vitro Transformation (s. u.) getestet wurden (DESROSIERS et al. 1984; DESROSIERS et al. 1985). Der für die Oncogenität entscheidende Bereich konnte dabei bis auf

einen einzigen, nämlich den in der Sequenz äußersten linken Leserahmen eingeengt werden, d.h. das Protein, das von diesem Leserahmen kodiert wird, ist für die Transformation von T-Lymphozyten und damit für die Oncogenität unverzichtbar (DESROSIERS et al., 12th Int. Herpesvirus Workshop, Philadelphia 1987). Ob es der einzige virale Faktor für die oncogene Wirkung ist, bleibt offen. Außerdem ist das entsprechende Protein in seiner Funktion noch nicht untersucht.

Aus den HVS-Induzierten Lymphomen lassen sich in der Regel permanent wachsende Zelllinien gewinnen, die erwartungsgemäß T-Zell-Charakter haben (RABSON et al. 1971; FLECKENSTEIN et al. 1977). Diese Zelllinien produzieren anfangs meist noch Virus, verlieren diese Eigenschaft aber nach mehreren Passagen oder sie schränken die Virusproduktion bis auf einen geringen Prozentsatz ein. Beispiele für solche Tumorzelllinien sind 1670, 70N2 (beide nicht produzierend), 77/5, 1926 und MLC-1 (produzierend).

Zwei Aspekte sind bei diesen Tumorzelllinien besonders interessant: Die Struktur der Virusgenome sowie die Methylierung weiter Bereiche der viralen DNA. Wie bei EBV-transformierten Zelllinien das EBV-Genom, so liegt auch das Genom von HVS in allen untersuchten Tumorzelllinien als geschlossene "supercolled" DNA vor (WERNER et al. 1977). Ob zusätzlich zu diesen episomalen Formen virale DNA-Sequenzen in das zelluläre Genom integriert sind, ist noch fraglich. Bei den nichtproduzierenden Zelllinien 1670 und 70N2 hat man in den Episomen große Deletionen, aber auch Neukombination viraler Genombereiche gefunden (DESROSIERS 1981; KASCHKA-DIERICH et al. 1982). In Abb. 2 ist dies für 1670 gezeigt. Der geschlossene Ring besteht aus 4 verschiedenen Stücken, 2 Teilen L-DNA (L1 und L2), zwischen die sich 2 Bereiche mit H-DNA einfügen. Verglichen mit dem linearen Genom von HVS entspricht L1 der kompletten L-DNA abzüglich einer Deletion von 13 MDa etwa im mittleren Bereich des Genoms, L2 repräsentiert ungefähr die linke Hälfte der L-DNA. Bei 70N2 ist der Aufbau des Episoms sehr ähnlich, lediglich das L2-Stück ist kleiner als bei 1670 (KASCHKA-DIERICH et al. 1982). Dagegen findet man bei Virusgenomen aus den produzierenden Zelllinien 1926 und 77/5 sowie bei DNA aus Tumorgewebe keine wesentlichen Veränderungen gegenüber dem Standardgenom (DESROSIERS 1982). Es liegen zwar auch hier geschlossene DNA-Ringe vor, aber mit nur einem H-Anteil und der vollständigen L-DNA. Dies bedeutet, daß die aus den Tumoren gewonnenen Zelllinien nach einigen Passagen starke Umlagerungen und Verluste größerer Bereiche erfahren können, was zur Folge hat, daß die Virusproduktion eingestellt wird.

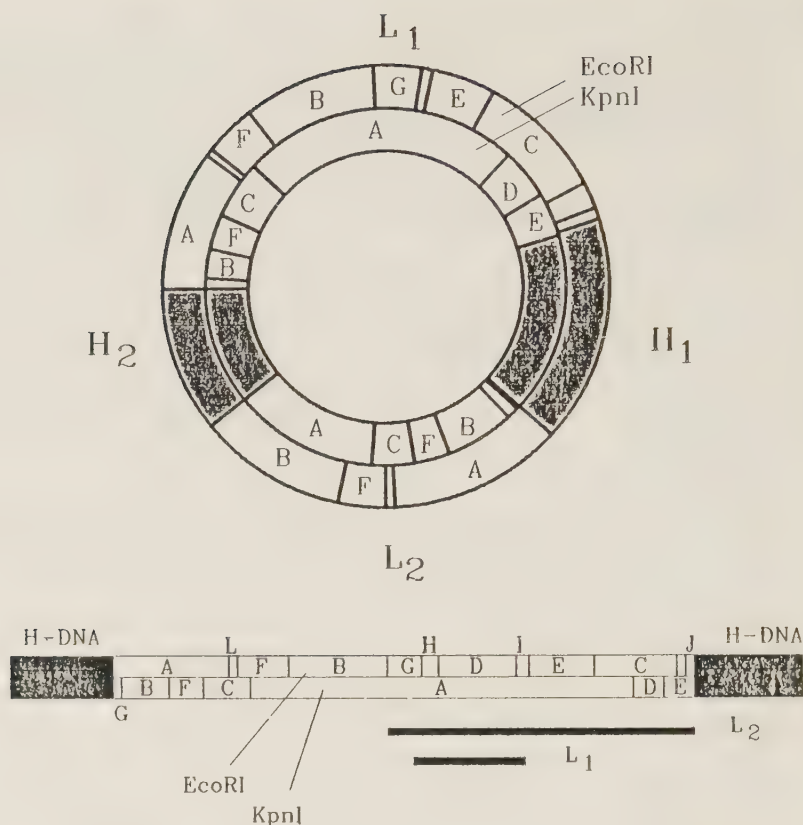


Abb. 2: Schematische Darstellung der DNA-Sequenz-Anordnung in den episomalen HVS-Genomen in der Tumorzelllinie 1670 (nach DESROSIERS 1981)

Im oberen Bildteil ist das 1670-Episom aufgezeichnet mit den 4 Teilstücken H_1 , H_2 (zwei Bereiche mit H-DNA), L_1 und L_2 (zwei unterschiedlich große Teilbereiche der L-DNA). Darunter ist zum Vergleich das Wildtyp-Genom (HVS Stamm 11) mit den EcoRI- und KpnI-Fragmenten angegeben. Die beiden schwarzen Linien bezeichnen diejenigen Bereiche der Wildtyp-L-DNA, die in den episomalen Teilstücken L_1 und L_2 deletiert sind.

Über die Genexpression in den Tumorzelllinien ist noch wenig bekannt, in 1970 wurde nur ein einziges Transkript entdeckt (KNUST et al. 1983a). Welche viralen Faktoren den transformierten Zustand in diesen Zelllinien, vor allem in den nicht mehr Virus produzierenden, aufrechterhalten, bleibt noch zu entschlüsseln. Für die geringe Transkription könnte eine Erklärung in der Methylierung der viralen Genome zu finden sein. Es ist bekannt, daß Methylierung von DNA-Regionen, d.h. die Bildung von 5-Methylcytosin im Dinukleotid CG, ein Mechanismus zur Abschaltung von Genen ist. In den transformierten Zelllinien hat man einen hohen Grad an Methylierung der viralen DNAs gemessen, sowohl bei produzierenden wie nicht produzierenden Zelllinien (DESROSIERS 1982). Das könnte erklären, warum bei den produzierenden Tumorzelllinien immer nur ein geringer Prozentsatz der Zellen zur Virusproduktion imstande ist. Lediglich etwa 20% des linken L-DNA-Randbereichs bleibt weitgehend unmethyliert. Auf die Bedeutung dieses Bereichs wurde bereits eingegangen (s. o.). Sie wird noch klarer, wenn man sich die in vitro Transformation von T-Lymphozyten mit HVS ansieht.

Während man mit Herpesvirus atele schon früher periphere T-Lymphozyten von Krallenaffen und anderen Arten in vitro immortalisieren konnte (FALK et al. 1974) ist dies mit HVS erst in letzter Zeit reproduzierbar gelungen (RABIN et al. 1984; DESROSIERS et al. 1986). H. Rabin und Mitarbeiter konnten T-Zellen von Nachtaffen transformieren, welche zuvor mit Phytohämagglutinin behandelt und in Interleukin-2-haltigem Medium kultiviert worden waren. Der Arbeitsgruppe von R. Desrosiers gelang mit verschiedenen Virusstämmen die in vitro Transformation bei peripheren T-Lymphozyten von *Callithrix jacchus* ohne Zuhilfenahme von Interleukin-2, allerdings versagte dieser Versuchsansatz bei T-Zellen von Krallenaffen und Nachtaffen. Die attenuierten HVS-Stämme waren nicht in der Lage, Zellen zu immortalisieren, das bedeutet, daß die in vivo fehlende oncogene Wirkung in vitro bestätigt werden kann. Werden die Deletionen dieser Virusmutanten durch Einrekombinieren der fehlenden Stücke beseitigt, so gewinnen die neukombinierten Viren ihre Oncogenität zurück (DESROSIERS et al. 1986).

Innerhalb der erwähnten 3 Gruppen, in die die HVS-Wildtypisolate nach Restriktionsmuster am linken Rand der L-DNA eingeteilt wurden (MEDVECZKY et al. 1984), gibt es eine, deren Mitglieder in den genannten Transformationsversuchen negativ reagierten. Darunter sind Virusstämmen, die schon in vivo, z.B. bei Nachtaffen, weniger oncogen waren als die Stämme aus den anderen beiden Gruppen. Dies beweist eine gewisse biologische Relevanz der Einteilung nach molekularen Gesichtspunkten des viralen Genoms. Es bleibt zu klären, wie diese Unterschiede sich in der Genexpression widerspiegeln.

6. Aufgabenstellung:

Herpesvirus saimiri wird im allgemeinen als ein Modellsystem zur Untersuchung der Oncogenität bei Herpesviren, speziell bei den lymphotropen gamma-Herpesviren, angesehen. Eine Vielzahl von experimentellen Ansätzen ergibt sich aus den biologischen Eigenschaften des Virus und aus den bisherigen Versuchsergebnissen in vitro und im experimentellen Wirtstier. Zum einen kann man die Biologie im natürlichen Wirt - Primärinfektion und Latenz - sowie in experimentell infizierten verwandten Affenarten - Tumorentwicklung sowie immunologischer Schutz gegen dieselbe - untersuchen. Andererseits geben permissive Zellkulturen und Tumorzelllinien die Möglichkeit, den lytischen Vermehrungszyklus sowie das Transformationsgeschehen auf molekularer Basis zu studieren. Hinzu kommt, daß man T-Lymphozyten in vitro transformieren kann, daß man attenuierte, nicht oncogene Varianten in vivo gefunden und in vitro konstruiert hat. Außerdem lassen die bei HVS gewonnenen Erkenntnisse bis zu einem gewissen Grad Rückschlüsse zu auf das nahe verwandte EBV, Homologien zwischen beiden Viren wurde gerade in letzter Zeit wieder deutlich durch die ersten Sequenzvergleiche (GOMPELS et al. 1988).

Zur Aufklärung der oncogenen Mechanismen von HVS ist es sinnvoll, zuerst einmal den lytischen Vermehrungsvorgang des Virus genauer zu analysieren sowie eine möglichst genaue Genomkartierung vorzunehmen. In vorausgegangenen Arbeiten wurde die Genexpression sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in anderen Labors in erster Linie auf der Proteinebene untersucht (MODROW und WOLF 1983a; RANDALL et al. 1983; KEIL et al. 1983). Durch in vivo Markierung von infizierten OMK-Zellen, durch Einsatz von Hemmstoffen zur Anreicherung der frühen Genprodukte sowie durch Immunpräzipitation mit HVS-spezifischen Seren konnten mehr als 30 virale Proteine identifiziert werden, etwa 1/3 davon als frühe Genprodukte. Glykosylierung und Phosphorylierung wurde bei einigen Proteinen nachgewiesen, Strukturproteine wurden identifiziert durch Markierung und Auftrennung von Virionen (MODROW 1983).

In Fortsetzung dieser Untersuchungen sollte es die Aufgabe in der vorliegenden Arbeit sein, die Genexpression und deren regulatorische Grundmuster auf der Ebene der Transkription anzuschauen. Von der Methodik her gesehen geschah dies sowohl durch in vitro Translation von gereinigten RNAs aus den infizierten Zellen im Retikulozytensystem als auch durch direkte Analyse der mRNAs über Northern-Blot-Hybridisierung. Ein weiterer Punkt war die Zuordnung der gefundenen

Polypeptide zu den kodierenden Regionen auf dem viralen Genom. Dies geschah durch in vitro Translation hybrid-selektierter RNAs. Sowohl eine Kartierung der Proteine als auch der mRNAs sollte damit erreicht werden, wobei im Idealfall ebenso eine Korrelation zwischen Protein und mRNA erzielt werden könnte.

Weiterhin sollte die Einteilung der Genprodukte in die zeitlich nacheinander auftretenden und damit auch funktionell verschiedenen Gruppen exakter ausgearbeitet werden, als dies in der in vivo Markierung aufgrund des störenden zellulären Backgrounds und der mangelhaften Synchronisation des Infektionsverlaufs möglich ist. Wichtigster Punkt war hierbei die Identifizierung der allerersten viralen Genprodukte im lytischen Zyklus wegen ihrer regulatorischen Eigenschaften, d.h. der Aktivierung späterer Gene im Replikationszyklus. Die Erarbeitung der Ergebnisse sollte in enger Abstimmung mit anderen Gruppen erfolgen, die am gleichen Virus arbeiten. Bestimmte Seren, monoklonale Antikörper sowie Sequenzinformation wurden hierzu von der Arbeitsgruppe von R. Honess (London) zur Verfügung gestellt.

1. Biologisches Material:

Die OMK-Zelllinie 637 zur Vermehrung von Herpesvirus salmirl stammte aus dem Labor von R. C. Desrosiers (New England Regional Primate Research Center, Harvard Medical School, Southborough, Massachusetts, USA).

Die HVS-Stämme 11 (= 11-o) und 11att waren ein Geschenk von L. Falk (ebenfalls New England Regional Primate Research Center, Southborough). Die rekombinanten Stämme S4 und KH3 wurden von der Arbeitsgruppe von R. C. Desrosiers zur Verfügung gestellt.

Die in den Immunpräzipitationen verwendeten Antiseren stammten aus der eigenen Arbeitsgruppe (Antiserum R1 von S. Modrow) sowie von R. E. Randall und R. W. Honess (anti11-o-, anti11att/MAK-, antiDBP- und antiTS-Serum) vom National Institute for Medical Research in London (GB) und aus dem New England Regional Primate Research Center (Affenseren).

Monoklonale Antikörper gegen HVS-Proteine wurden von R. E. Randall und R. W. Honess zur Verfügung gestellt.

Plasmid-klonierte Fragmente des HVS-Genoms waren Geschenke der Arbeitsgruppe von B. Fleckenstein in Erlangen (EcoRI- und KpnI-Fragmente kloniert in pACYC184, pJC81 bzw. pWD7) und von R. W. Honess (EcoRI C kloniert in pACYC184 und HindIII G kloniert in pUC8).

2. Zellkultur:

Zur Vermehrung der verschiedenen HVS-Stämme wurde die OMK-Zelllinie 637 (OMK = owl monkey kidney; semipermanente Zelllinie aus Nierenepithelzellen von Nachtaffen) verwendet, die als Zellrasen ("monolayer") in Glas- oder Plastikflaschen wächst. Die Zellen wurden in MEM ("minimal essential medium") mit Earle's Salzen gezüchtet. Dem Medium wurden 10% hitzeinaktiviertes foetales Kälberserum (FKS) sowie pro ml je 200 IE Penicillin, 200 µg Streptomycin und 7.5 µg Glutamin zugesetzt (Medium und FKS von Gibco-BRL). Die Zellkulturen wurden bei 37°C im Brutschrank gehalten und nach 4 - 7 Tagen jeweils 1 : 3 gesplittet. Dabei wurde der Zellrasen durch kurze Inkubation mit einer 0.25%igen Trypsinlösung vom Untergrund abgelöst. Die Zellkulturen wurden etwa bis zur 50. Passage für Versuche hergenommen und danach durch frisch aufgetaute Zellen

ersetzt. Zellen der 17. Passage wurden als Ausgangskulturen über flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3. Virusvermehrung:

In den im folgenden beschriebenen Versuchen wurden die Herpesvirus saimiri Stämme 11 (Wildtyp), 11att (attenuierte Variante von Stamm 11) sowie zwei in vitro rekombinierte Stämme, KH3 und S4, verwendet.

OMK-Zellen wurden 2 - 3 Tage nach vorausgegangenem Splitten mit Virusstocklösung infiziert. Nach Zugabe der Viruslösung wurden die Kulturflaschen etwa 2 Std bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert, um die Viren an die Zellen zu adsorbieren. Danach wurde frisches Medium (mit 2% FKS) zugegeben und die Zellen bei 37°C gehalten, bis der Zellrasen durch die Virusinfektion vollständig zerstört war. Die Überstände dieser Infektionen wurden gesammelt und als Stocklösung bei 4°C aufbewahrt bis zur nächsten Infektion.

4. RNA-Extraktion aus OMK-Zellen:

Die Extraktion von RNA erfolgte in allen Fällen über eine Lysierung der Zellen mit Guanidinthiocyanat und anschließende Reinigung über einen Cäsiumchlorid-Gradienten (modifiziert nach CHIRGWIN et al. 1979). Die Zellen wurden dazu entweder mit Hilfe von Trypsinlösung geerntet oder in den Kulturflaschen direkt lysiert. Im ersten Fall wurde das Medium entfernt und mit kalter PBS-Lösung nachgespült. Dann wurde kurz mit 0.25%iger Trypsinlösung inkubiert, bis die Zellen sich vom Boden lösten, die abgelösten Zellen wurden in PBS aufgenommen und gesammelt. Die Zellen wurden pelletiert (10 min 1000 rpm in Rotixa-Zentrifuge, Hettich), mit PBS gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit NGM-Lösung (NGM = 4 M Guanidinthiocyanat (Fluka), 0.5 M Mercaptoethanol (Bio-Rad), 50 mM Natriumacetat pH 5.5) lysiert. Bei der direkten Lyse in den Kulturflaschen wurde der Zellrasen nach Entfernen des Mediums mit PBS gespült, die Flüssigkeit entfernt und dann je 1 - 2 ml NGM-Lösung pro Flasche zugegeben, um die Zellen durch sorgfältiges Verteilen dieser Lösung über den Zellrasen zu lysieren. Die Zelllysate aus den einzelnen Flaschen wurden gesammelt. In beiden Fällen wurden die Zelllysate in der Ultrazentrifuge bei 20.000 rpm und 5°C (TST 41.14-Rotor, Kontron) zentrifugiert, um nicht vollständig lysiertes Zellmaterial abzutrennen. Der Überstand aus diesem

Zentrifugationsschritt wurde in 14-ml-Polyallomer-Röhrchen auf ein CsCl-Kissen (2 ml CsCl (Biomol), Dichte 1.8 g/cm³; dazu wurde die abgewogene Menge CsCl sterilisiert durch 4 Std Erhitzen auf 180°C und gelöst in 10 mM Triethanolamin/1 mM EDTA, pH 7.4) aufgetragen. In der anschließenden Zentrifugation (20 - 22 Std bei 35.000 rpm, 15°C im TST 41.14-Rotor) wurde die RNA durch das CsCl-Kissen hindurch pelletiert und damit von DNA und Proteinen getrennt. Das RNA-Pellet wurde vorsichtig entnommen, in TEA/EDTA-Lösung resuspendiert und durch kurzzeitiges Erwärmen vollständig gelöst. Nach Extraktion mit Chloroform/4% Isoamylalkohol wurde die RNA-Lösung auf 0.2 M NaCl oder 0.3 M Na-acetat gebracht und mit 2.5x Vol. abs. Ethanol gefällt (bei -20°C über Nacht). Die präzipitierte RNA wurde pelletiert (30 min 10.000 rpm in Kühlzentrifuge), zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in sterilem bidest. Wasser aufgenommen. Nach Messung der Konzentration im Spektralphotometer wurden die RNA-Proben bei -70°C aufbewahrt.

RNA wurde nach der beschriebenen Methode präpariert aus:

1. nicht infizierten OMK-Zellen,
2. OMK-Zellen, die mit Herpesvirus salmirl 20 - 25 Std infiziert waren (= späte RNA, Zellen bereits mit beginnendem cytopathischen Effekt),
3. infizierten OMK-Zellen, die mit Cycloheximid (100 µg/ml im Medium) oder mit Anisomycin (1 mM im Medium) behandelt wurden, um die zelluläre Proteinsynthese zu hemmen (= immediate early RNA; Zellen nach 6 - 12 Std geerntet),
4. infizierten OMK-Zellen, die mit Phosphonoacetat (200 µg/ml im Medium) behandelt wurden, um die virusspezifische DNA-Polymerase zu hemmen und damit frühe Produkte anzureichern (early oder frühe RNA; Zellen nach 15 - 18 Std geerntet),
5. infizierten OMK-Zellen zu verschiedenen kürzeren Zeitpunkten nach der Infektion mit Herpesvirus salmirl (4 Std, 6 Std, 8 Std, 10 Std, 12 Std), um die frühe Genexpression im zeitlichen Verlauf zu untersuchen.

5. In vitro Translation:

5.1. Präparation des Retikulozyten-Lysats:

Zwei bis drei kg schwere Kaninchen wurden durch subkutane Injektion von 1.25% Acetylphenylhydrazin (Sigma) an 5 Tagen hintereinander anämisch gemacht. Nach einer Erholungsphase von 3 Tagen zur Neubildung von Retikulozyten wurden

die Tiere betäubt und durch Herzpunktion entblutet. Injektionen und Entbluten der Tiere wurden von Frau Dr. R. Scheid durchgeführt. Das entnommene Blut wurde sofort mit dem gleichen Volumen kalter Saline-Lösung (0.14 M NaCl, 1.5 mM Mg-Acetat, 5 mM KCl) und Heparin gemischt. Die Blutzellen wurden pelletiert (10 min 2000 g) und mehrmals mit Saline-Lösung gewaschen. Die weißen Blutkörperchen, die sich als "buffy coat" über den Erythrozyten ansammeln, wurden mit einer Pasteurpipette vollständig entfernt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Retikulozyten lysiert, indem das gleiche Volumen steriles bidest. Wasser zugegeben wurde. Das so entstandene Lysat wurde 15 min bei 30.000 g und 4°C zentrifugiert und anschließend sofort in 1 ml Aliquots fraktioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

5.2. Nuclease-Verdau des Rohlysats (nach PELHAM und JACKSON 1976):

Die 1 ml Aliquots wurden je nach Bedarf aufgetaut, mit Micrococcus-Nuclease behandelt und dann in kleineren Portionen bis zur in vitro Translation über flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Nuclease-Verdau wurde das Lysat zunächst aufgetaut und dabei schon mit einer Stocklösung von Hämin (Sigma, in 85% Ethylenglykol, 10 mM Tris pH 7.5) auf eine Konzentration von 25 µM Hämin gebracht. Damit soll die Aktivierung eines durch Hämin reprimierten Inhibitors der Proteinsynthese verhindert werden (DATTA et al. 1978). Das aufgetaute Lysat wurde auf eine Konzentration von 1 mM CaCl_2 gebracht, und nach Zugabe von 1 Einheit der Ca^{2+} -abhängigen Micrococcus-Nuclease (Sigma) wurde es 15 min bei 20°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurde die Nuclease durch EGTA (2 mM Endkonzentration) gestoppt, und das Lysat nach Zugabe von Creatinphosphokinase (Sigma; ca 30 Einheiten/ml eingesetzt) portioniert in 100- und 200-µl-Aliquots. Jedes 1-ml-Aliquot wurde nach dem Nuclease-Verdau in einer Probetranslation mit und ohne zusätzliche RNA getestet. Die Ausbeute an Proteinsynthese wurde dabei durch TCA-Präzipitation bestimmt.

Folgende Stocklösungen wurden für die in vitro Translation hergestellt:

1. Aminosäure-Pool: Alle Aminosäuren (Sigma) bis auf Cystein und Methionin waren in diesem Pool in einer Konzentration von je 2.5 mM gelöst. Cystein war im sogenannten Master-Mix (s. u.) enthalten, Methionin wurde jeweils separat mit ^{35}S -Markierung (Amersham) zugegeben, um die Translationsprodukte radioaktiv zu markieren.

2. Master-Mix: Diese Stocklösung enthielt verschiedene Substanzen zur Ergänzung des Translationsansatzes, sie war wie folgt zusammengesetzt: 800 mM HEPES (2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure, Merck) pH 7.5, 400 mM

Creatinphosphat (Boehringer), 40 mM ATP (Boehringer), 2 mM GTP (Boehringer), 40 mM Dithiothreitol (=DTT, Sigma), 20 mM Spermidin (Sigma) und 2 mM Cystein.

3. 1 M Kaliumacetat

4. 20 mM Magnesiumacetat

5. 5 mg/ml Kalbsleber-tRNA (Boehringer)

5.3. Translationsansatz:

Im allgemeinen wurden einzelne Translationen in einem Gesamtvolumen von 15 μ l angesetzt. Dazu wurde zunächst die entsprechende RNA (ca 4.5 μ g Gesamt-RNA in 1 - 1.5 μ l H₂O oder eine Probe hybrid-selektierter mRNAs, s. u.) in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß abgefüllt, zur Auflockerung der Tertiärstruktur 90 sec auf 100°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Dann wurden folgende Lösungen zugegeben: 0.4 μ l Master-Mix, 0.3 μ l Aminosäuremix, 1.5 μ l ³⁵S-Methionin (800 Ci/mmol), 0.3 μ l tRNA, 1.0 μ l 1 M Kaliumacetat, 1.0 μ l 20 mM Magnesiumacetat und 9.0 μ l Retikulozytenlysat zugegeben (die optimalen Mengen an Kalium- und Magnesiumacetat wurden in Vorversuchen ermittelt) und der Ansatz mit sterilem bidest. Wasser auf 15 μ l aufgefüllt. Da pro Experiment jeweils 10 - 20 oder mehr einzelne Translationen angesetzt wurden, wurde für die entsprechende Anzahl von Ansätzen ein Premix aus Master-Mix, Aminosäuremix, Methionin, Salzen und tRNA hergestellt und auf die RNA-Proben verteilt. Danach wurde erst das Lysat aufgetaut und ebenfalls zupipettiert. Die Ansätze wurden gemischt und ganz kurz abzentrifugiert. Danach wurden sie 2 Std bei 30°C inkubiert und anschließend auf Eis abgestoppt. Die Translationsprodukte wurden dann entweder direkt auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt oder einer Immunpräzipitation unterworfen.

5.4. Translation mit Processing:

Zur Analyse von cotranslationalem oder posttranslationalem Prozessieren von viralen Polypeptiden wurde eine in vitro Translation von hybrid-selektierten mRNAs unter Zugabe von microsomalen Membranen durchgeführt. Dazu wurden zu dem Standardansatz 5 μ l eines kommerziell erhältlichen Membranenpräparats aus Hundepankreas (Amersham) zugesetzt. Die Inkubation sowie die folgende Auftrennung der Translationsprodukte verlief wie bei den anderen Translationsansätzen.

6. Immunpräzipitation:

Mehrere Herpesvirus saimiri-spezifische Antiseren sowie ein Satz von verschiedenen Monoklonalen Antikörpern standen zur Verfügung, um die virusinduzierten Proteine näher zu charakterisieren:

1. ein Kaninchen-Pool-Serum (=R1-Serum) gegen die Strukturproteine von Herpesvirus saimiri Stamm 11, das durch Injektion aufgereinigter Viruspartikel in drei Kaninchen gewonnen worden war (MODROW 1983);

2. ein Kaninchenserum gegen virusspezifische Proteine, das durch Injektion eines Proteingemischs aus HVS-11-Infizierten OMK-Zellen erzeugt worden war (anti11-o-Serum);

3. ein Kaninchenserum gegen Proteine aus HVS-11att-Infizierten Nierenzellkulturen von Makaken (anti11att/MAK-Serum);

4. ein Kaninchenserum gegen virale DNA-bindende Proteine (antiDBP-Serum), welches nach Anreicherung der DNA-bindenden Proteine aus einem Proteingemisch heraus mit Hilfe einer Hydroxylapatit-Säule gewonnen worden war;

5. ein monospezifisches Kaninchenserum gegen die viruskodierte Thymidylat-Synthase (antiTS-Serum);

(die unter 2. - 5. genannten Antiseren wurden von der Arbeitsgruppe von R. W. Honess zur Verfügung gestellt)

6. verschiedene Affenseren aus Herpesvirus saimiri-Infizierten Tieren (Totenkopffaffen - Saimiri sclerous; Klammeraffe - Ateles sp.; Weißlippenaffen - Sagulnus fuscicollis; die beiden letzteren mit Tumorentwicklung);

7. Monoklonale Antikörper gegen verschiedene Proteine von Herpesvirus saimiri (RANDALL et al. 1984a) wurden von R. E. Randall und R. W. Honess zur Verfügung gestellt.

(a) Immunpräzipitation mit Antiseren:

Die Ansätze aus der in vitro Translation wurden auf Eis abgestoppt und mit 50 µl Puffer (1% Triton X100 (Serva), 0.1% SDS, 0.137 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10% Glycerin und 20 mM Tris pH 9.0) sowie 1 - 5 µl des entsprechenden Antiserums versetzt und ca 3 Std bei 4°C inkubiert. Dann wurden in Immunpräzipitationspuffer vorgequollene Protein-A-Sepharose-Beads (Pharmacia) zugegeben (Je 3mg in 100 µl Puffer pro Ansatz) und auf einem Schüttler 1 Std bei Raumtemperatur mit den Immunkomplexen reagieren lassen. Die Sepharose-Beads wurden pelletiert (5 min 3000 rpm in Rotixa-Zentrifuge, Hettich) und dreimal mit Puffer sowie einmal mit dest. Wasser gewaschen. Der Überstand

wurde verworfen, und die Pellets wurden jeweils in 25 µl PAGE-Auftragspuffer (s. u.) aufgenommen und 5 min auf 100°C erhitzt.

(b) Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern:

Die Immunpräzipitation wurde in gleicher Weise wie unter (a) durchgeführt, wobei als Puffer 0.65 M NaCl, 1% Nonidet P40 (Fluka), 1 mM EDTA und 10 mM TrisHCl, pH 7.5 verwendet wurde. Pro Ansatz wurden 3 - 5 µl Aszitesflüssigkeit mit den jeweiligen monoklonalen Antikörpern eingesetzt. Die Inkubationszeiten waren meist etwas länger als bei (a), d.h. 5 Std oder über Nacht, wenn Produkte aus der Translation von hybrid-selektierten mRNAs präzipitiert werden sollten. Abtrennung der Immunkomplexe mit Protein A sowie anschließende Reinigung und Auftrennung der Proteine erfolgte wie unter (a).

7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE):

Die Produkte aus den in vitro Translationsansätzen wurden jeweils auf Polyacrylamidgelen in einem diskontinuierlichen Puffersystem (LAEMMLI 1970) aufgetrennt, gegebenenfalls nach vorausgehender Immunpräzipitation. Dabei wurde Diallyltartardiamid (=DATD, Bio-Rad) als Vernetzersubstanz eingesetzt. Das Trenngel war zusammengesetzt aus 12.5% oder 15% Acrylamid (Bio-Rad), 0.026% DATD, 0.15% SDS, 0.375M Tris pH 8.5. Das Sammelgel enthielt 3.1% Acrylamid, 0.08% DATD, 0.1% SDS, 0.125M Tris pH 7.0. Als Starter zur Polymerisation wurden 0.14 mM Ammoniumperoxodisulfat und 0.035% N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (beides von Bio-Rad) eingesetzt. Der Elektrophoresepuffer war 25 mM Tris, 0.192 M Glycin, 0.1% SDS pH 8.5.

Die Proben wurden zur Denaturierung vor der Elektrophorese auf 2% SDS, 5% Mercaptoethanol, 3% Sucrose und 50 mM Tris pH 7.0 gebracht und 5 min auf 100°C erhitzt. Als Molekulargewichtsmarker dienten Myosin (200 kD), β -Galaktosidase (116 kD), β -Phosphorylase (96 kD), bovines Serumalbumin (68 kD), Ovalbumin (45 kD) und Carboanhydrase (30 kD) (Proteinmarker-Kit von Sigma).

Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 5 mA/cm² über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden die Gele in einem Gemisch aus Eisessig/Isopropanol/Wasser (1:1:4) und 0.5% Coomassie-Brillant-Blue (Bio-Rad) 1 Std fixiert und gefärbt. Nach dem Entfärben in Eisessig/Isopropanol/Wasser (1:1:8) wurden sie mit einem Slab-Gel-Dryer auf Whatman 3MM Filterpapier getrocknet. Die getrockneten Gele wurden in einer Kassette mit Hyperfilm- β max (Amersham) bei Raumtemperatur exponiert.

8. Plasmidpräparation:

Zur Hybridisierung der Northern Blots und zur Hybrid-Selektion von mRNAs wurden plasmid-klonierte Genomfragmente von Herpesvirus saimiri verwendet. Eine schematische Darstellung des viralen Genoms mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen (EcoRI, KpnI, MspI, BamHI u. a.) und den klonierten Fragmenten ist in Abbildung 3 gegeben. EcoRI-Restriktionsfragmente (B - I, K und L) waren in pACYC184 kloniert, KpnI-Fragmente (B, C, D, F) in pJC81 und die beiden Randstücke (im folgenden KpnI G und KpnI E genannt, obwohl die Schnittstelle zur H-DNA hin SmaI ist) in pWD7 (KNUST et al. 1983b). Das Fragment HinfIII G war in pUC8 kloniert, weitere Teilstücke der genannten Genomfragmente wurden subkloniert in pUC18 (s. u.). pACYC184, pJC81 und pWD7 waren in *E. coli* HB101, die pUC-Plasmide in *E. coli* JM109 enthalten.

Die Bakterien wurden in L-Broth-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (15 µg/ml Tetracyclin (Sigma) bei pACYC184 und pJC81; 50 µg/ml Ampicillin (Biomol) bei pWD7 und den pUC-Plasmiden) gezüchtet.

Für eine Plasmidpräparation wurden 400 ml L-Broth mit einer Übernachtskultur von 5 ml beimpft und 24 Std wachsen lassen. Die Bakterien wurden pelletiert (10 min 5000 rpm in A6.9-Rotor, Kontron) und dann in 8 ml 15% Sucrose, 0.05 M Tris pH 8.5, 0.05 M Na₂EDTA mit 5 mg/ml Lysozym (Sigma) resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 8 ml Triton-Lösung (0.1% Triton X100 in 0.05 M Tris pH 8.5, 0.05 M Na₂EDTA) zugegeben, der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 20 min bei RT inkubiert oder auf 37°C erwärmt, bis die Lösung aufgrund der aus den Bakterien austretenden Plasmid-DNA zähflüssig wurde. Die Bakterienreste wurden mit 15000 rpm 1 Std (A8.24-Rotor, Kontron-Kühlzentrifuge) abzentrifugiert, der Überstand wurde zur CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation hergenommen. Pro ml Plasmid-Lösung wurden 0.9 g CsCl zugegeben, so daß eine Dichte von 1.59 g/ml erreicht wurde. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (Sigma) wurden die Gradienten 30 Std bei 40000 rpm in der Ultrazentrifuge (TFT-65.13-Rotor, Kontron) zentrifugiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA-Bande mit einer Spritze abgezogen, dreimal mit NaCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert und 2 Std lang gegen TE-Puffer dialysiert. Nach der Dialyse wurde die DNA mit 2x Vol. Ethanol präzipitiert, gewaschen mit 70% Ethanol, lyophilisiert und in TE pH 8.0 aufgenommen.

Einige größere Fragmente des HVS-Genoms wurden, soweit entsprechende Restriktionsschnittstellen bekannt waren, in kleinere Stücke geschnitten und nach Standard-Klonierungstechniken (MANIATIS et al. 1982) in pUC18-Plasmide

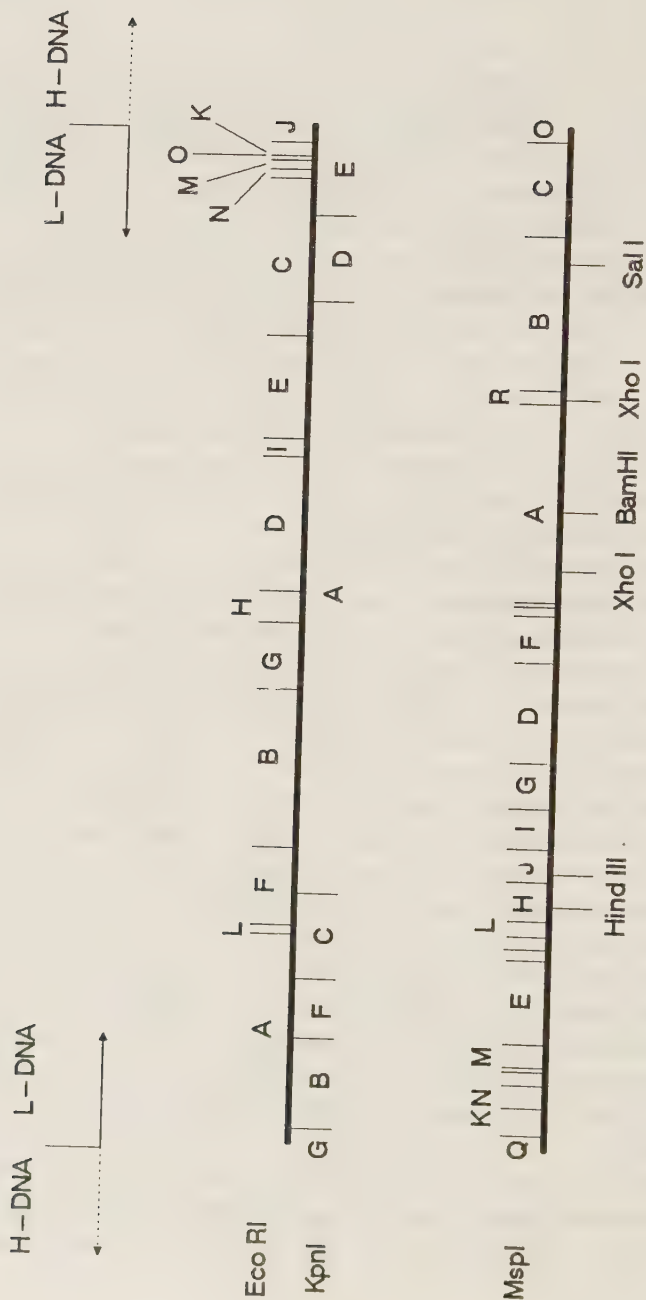


Abb. 3: Darstellung des Genoms von *Herpesvirus saimiri* mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen

(VIEIRA und MESSING 1982; YANISCH-PERRON et al. 1985) subkloniert. Dabei wurden MspI-geschnittene Fragmente in die AccI-Schnittstelle und XhoI-geschnittene Fragmente in die SalI-Stelle innerhalb der "multiple cloning site" von pUC18 inseriert. Die ligierten Plasmid-DNAs wurden in *E. coli* JM109 transfiziert. Die erhaltenen Bakterienklone wurden in gleicher Weise wie oben beschrieben behandelt.

9. Hybrid-Selektion von HVS-spezifischen mRNAs:

Die Selektion von viralen mRNAs wurde durch eine Hybridisierung von filtergebundenen Genomfragmenten mit den Gesamt-RNA-Proben aus infizierten OMK-Zellen durchgeführt. Dazu wurden zunächst kleine Filter (5 x 5 mm) aus Nitrocellulose BA85 (Schleicher & Schuell) mit je 8 - 10 µg Plasmid-DNA betropft, die über CsCl-Gradienten gereinigt worden war (s. o.). Die DNA wurde vor dem Auftropfen durch Beschallen und 10 min Kochen zerstückelt (ca 1000 bp lange Fragmente) und denaturiert. Die Filter wurden getrocknet, dann mit 6x SSC gespült (1x SSC = 0.15 M NaCl und 0.015 M Na-citrat) und bei 80°C 2 Std gebacken. Danach wurden die Filter zweimal in sterilem bidest. Wasser je 90 sec gekocht und im Eisbad abgekühlt, um die nicht festgebackene DNA zu entfernen. Erst dann wurden sie für eine Hybridisierung verwendet. Je zwei dieser Filter wurden in einem 1.5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegen 25 - 100 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 100 µl hybridisiert. Die Hybridisierungslösung enthielt 45% deionisiertes Formamid, 20 mM PIPES (=Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure), Sigma) und 0.4 M NaCl, pH 7.0. Bei dieser Formamid-Konzentration und bei dem GC-Gehalt des viralen L-Genomanteils von 36% errechnet sich eine T_m von etwa 65°C. Deshalb wurde eine Hybridisierungstemperatur von 50°C gewählt, um mit dieser relativ hohen Stringenz nur spezifische Hybridisierung zu erhalten. Die Ansätze wurden 2 Std inkubiert. Dann wurde die Hybridisierungslösung entnommen, und die Filter wurden intensiv gewaschen: sechsmal mit 1x SSC, 0.5% SDS bei 60°C und anschließend dreimal mit 2 mM EDTA bei RT. Die selektierten mRNAs wurden von den Filtern in 300 µl steriles bidest. Wasser eluiert durch 75 sec Kochen und schnelles Abkühlen in einem Methanol-Eisbad. Die RNAs wurden dann präzipitiert mit 2.5x Vol. Ethanol bei -70°C, abzentrifugiert, gewaschen mit 70% Ethanol, lyophilisiert und in je 5 µl sterilem bidest. Wasser aufgenommen. Diese RNA-Probe wurde für zwei bis drei in vitro Translationsansätze hergenommen. Die Filter aus der Hybridisierung wurden durch zweimaliges

Kochen, wie oben beschrieben, gereinigt und dann wiederverwendet (bis zu fünfmal).

10. Elektrophorese und Blotten von RNA:

Die elektrophoretische Auftrennung der RNA-Proben erfolgte auf denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gelen, die anschließend auf Nylon-Membranen (Hybond-N von Amersham) geblottet wurden. Zur Denaturierung wurden je nach RNA-Probe 1 - 10 µg GesamtRNA in einem Ansatz mit 50% deionisiertem Formamid, 2,2 M Formaldehyd (beides von Merck) und 1x MOPS-Puffer (10x MOPS = 0,2 M 3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure (Fluka), 0,05 M Na-acetat pH 7,0, 0,01 M Na₂EDTA) 10 min auf 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die 10x14 cm großen Gele (Vol. 80 ml, Dicke ca 3-4 mm) enthielten 1% Agarose (Sigma) und 2,2 M Formaldehyd in 1x MOPS-Puffer. Die Proben wurden mit Bromphenolblau (Sigma) als Marker versetzt und auf eine Konzentration von 0,5% Glycerin gebracht. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei 120 - 150 V und dauerte 3 - 4 Std. Als RNA-Größenmarker dienten die internen eukaryotischen rRNAs (28S und 18S) sowie in einer zusätzlichen Probe die rRNAs von *E. coli* (23S und 16S). Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel auf eine fluoreszierende Kieselgelplatte gelegt und die rRNAs wurden durch Bestrahlen mit einer UV-Lampe sichtbar gemacht, ihre Laufstrecke ausgemessen. Die RNA-Gele wurden dann in einer Saugblott-Vorrichtung mit 20x SSPE als Blotting-Puffer (20x SSPE = 3,6 M NaCl, 0,2 M Na-phosphat, 0,02 M Na₂EDTA, pH 7,4) auf Hybond-N-Membranen geblottet (ca 15 Std lang). Zur kovalenten Fixierung der RNA auf der Nylon-Membran wurde der Northern Blot ca 10 min mit UV-Licht (Wellenlänge 302 nm) bestrahlt. Danach wurden die Blots, in Plastikfolie eingewickelt, bis zur Hybridisierung bei 4°C aufbewahrt.

11. Elution von DNA-Banden aus Agarosegelen:

Für die Hybridisierung der Northern Blots wurden die in Frage kommenden viralen DNA-Fragmente aus den Plasmiden ausgeschnitten, auf Agarosegelen aufgetrennt, aus den Gelen eluiert und aufgereinigt.

Je nach Größe des Inserts wurden 10 - 50 µg Plasmid-DNA in 20 - 100 µl Ansätzen mit den jeweiligen Restriktionsenzymen (Boehringer) ca 2 - 4 Std bei

37°C nach den Angaben des Herstellers verdaut. Die Ansätze wurden dann mit 1/10xVol Stop-Puffer (= 5 mg/ml Xylencyanol (Sigma), 5 mg/ml Bromphenolblau, 50% Sucrose, 50 mM EDTA) auf Eis abgestoppt. Die Agarosegele (100 ml) enthielten 0.7 - 1.5% Agarose in Tris-Acetat-Puffer (40 mM TrisHCl, 20 mM Na-acetat, 2 mM EDTA, pH 7.8). Zur Markierung der DNA wurde 50 ng/ml Ethidiumbromid (Sigma) zugegeben. Als DNA-Größen-Marker wurden HindIII-Fragmente von Lambda-Phagen-DNA verwendet (Boehringer). Die Elektrophorese in Tris-Acetat-Puffer erfolgte bei ca 35 V über Nacht. Danach wurden Gelstücke mit den entsprechenden DNA-Banden ausgeschnitten, in Dialysemembranen gegeben, und die DNA bei 100 V ca 2 Std in Tris-Acetat-Puffer elektroeluiert. Die DNA wurde über Elutip-D-Säulen (Schleicher & Schuell) nach den Angaben des Herstellers gereinigt und in 1.5-ml-Reaktionsgefäße eluiert. Das Ethidiumbromid wurde durch mehrmaliges Extrahieren mit Isopropanol entfernt, die DNA wurde gefällt, getrocknet und anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

12. Hybridisierung von Northern Blots:

Die Northern Blots wurden mit ^{32}P -markierten eluierten DNA-Fragmenten ohne den Plasmidanteil hybridisiert. Dazu wurden die eluierten DNA-Stücke zunächst in einer "nick-translation"-Reaktion mit ^{32}P -dCTP (>3000 Ci/mmol) radioaktiv markiert. In einem Ansatz von 25 μl wurden 0.25 μg DNA mit einem kommerziellen Nick-translation-System (von Amersham) 2 Std bei 20°C inkubiert. Die Nukleotide wurden hinterher über eine Bio-Gel-A1.5-Säule (Bio-Rad) mit TEN-Puffer (= 100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) abgetrennt. Die radioaktiv markierte DNA wurde 10 min bei 100°C denaturiert und dann dem Hybridisierungsansatz zugegeben.

Die Northern Blots wurden in Plastikfolien ca 6 Std bei 50°C mit unspezifischer DNA vorhybridisiert. Die Vorhybridisierungslösung enthielt pro Blot in 20 ml Gesamtvolumen 5 ml 20x SSPE, 6 ml deionisiertes Formamid (d.h. 30% im Ansatz), 2 ml 50x Denhardt's Solution (50x D. S. = 1% (w/v) Rinderserum-Albumin (Sigma), 1% Ficoll (Pharmacia) und 1% Polyvinyl-pyrrolidon (Sigma)) sowie 1.0 mg denaturierte Kalbsthymus-DNA (Boehringer).

Nach dem Vorhybridisieren wurde dem Ansatz die denaturierte radioaktiv markierte DNA zugegeben und weitere 15 - 20 Std bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Blots gewaschen. Zunächst wurden die Blots in 5x SSPE zweimal je 15 - 20 min bei 60°C inkubiert, dann 20 min in 1x SSPE, 0.1% SDS bei 60°C und abschließend 20 - 30

min in 0.1x SSPE, 0.1% SDS bei RT. Die noch feuchten Blots wurden in Haushaltsfolie eingepackt und bei -70°C mit Kodak-Xomat-S-Film exponiert.

Die Northern Blots wurden in der Regel mehrfach zum Hybridisieren verwendet. Dabei wurden die hybridisierten radioaktiv markierten Proben vor einer erneuten Hybridisierung jeweils durch 2 - 4 Std Inkubation der Blots bei 65°C in 5 mM Tris-HCl, 2 mM Na₂EDTA, 0.1x Denhardt's Solution, pH 8.0 abgewaschen.

ERGEBNISSE

1. Virusvermehrung und RNA-Extraktion:

Herpesvirus saimiri läßt sich in mehreren epitheloiden Zelllinien von Altwelt- und Neuwelt-Affenarten lytisch vermehren mit unterschiedlich guten Ausbeuten. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich OMK-Zellen benutzt, d.h. Nierenepithelzellen von Nachtaffen (*Aotus trivirgatus*). Diese Zelllinie ergibt die höchsten Ausbeuten an Virusproduktion und ist daher die am häufigsten verwendete (FLECKENSTEIN und DESROSIERS 1982). Die Zellen wurden in Glas- oder Plastikflaschen mit MEM/Earle's Salzen gezüchtet und etwa alle 5 - 7 Tage 1:3 gesplittet unter Verwendung von Trypsin/Versen zum Ablösen und Trennen der Zellen. Infektionen mit den verschiedenen Stämmen von Herpesvirus saimiri verliefen in allen Fällen gleichmäßig gut, die Zellmonolayer waren bei einem Virusinokulat von im allgemeinen 1 - 2 PFU/Zelle stets nach 2 - 3 Tagen durch die Virusvermehrung vollständig zerstört. Nach dem Erreichen eines vollständigen CPE wurde der virushaltige Überstand als Virusstock bei 4°C aufbewahrt und konnte auch nach mehreren Monaten noch mit unverminderter Infektiosität für die Virusinfektion verwendet werden.

Zur Extraktion von RNA aus virusinfizierten OMK-Zellen wurden die Monolayer ebenfalls mit 1 - 2 PFU/Zelle infiziert, wobei etwa 2 Std lang eine Virusadsorption bei RT unter gleichmäßigem leichtem Schütteln durchgeführt wurde. Die Infektion erfolgte jedes Mal 2 - 3 Tage nach dem letzten Splitten der Zellen. Um sogenannte "späte" RNA zu gewinnen, d.h. die viralen mRNA-Spezies für die Proteine der späten Infektionsphase, wurden die Zellen nach ca 20 Std geerntet, wenn viele schon durch Abrundung und vereinzelt auch durch Ablösen aus dem Zellverband den beginnenden CPE anzeigten. Bei Infektion mit gleichzeitiger Hemmung durch Cycloheximid wurde nach 8 - 12 Std, bei Hemmung mit PAA nach ca 15 Std RNA extrahiert (im ersten Fall wird die RNA als "immediate early", im zweiten Fall als "frühe" bzw. "early" RNA bezeichnet; diese Bezeichnungen werden im folgenden stets gemäß dieser Definition gebraucht). In beiden Fällen wurde auch nach längerer Inkubationszeit kein virusspezifischer CPE sichtbar, wodurch der Erfolg der Inhibition bestätigt wurde.

Die Präparation der gesamten zellulären RNA erfolgte durch die

Guanidinthiocyanat-Methode (CHIRGWIN et al. 1979), wobei die OMK-Zellen entweder in den Kulturfラスchen oder nach vorangegangener Zellernte mit 4 M Guanidinthiocyanat, 0.5 M Mercaptoethanol lysiert wurden. Dabei wurde erreicht, daß die zellulären RNAsen sehr effektiv denaturiert wurden, was Voraussetzung war für die Gewinnung einer Intakten translatierbaren RNA. Die RNA wurde über CsCl-Gradienten gereinigt und nach Ethanol-Fällung lyophilisiert, danach in sterilem bidest. Wasser gelöst und bei -70°C gelagert. Bei diesen Bedingungen erwiesen sich die verschiedenen RNA-Proben auch nach bis zu 3 Jahren noch als vollständig translatierbar, selbst bei vielfachem Auftauen und Einfrieren. Die Ausbeute an RNA wurde im Spektralphotometer bestimmt (Spektrum von 320 - 220 nm Wellenlänge), wobei auch eine Aussage über die Reinheit getroffen werden konnte. Im Durchschnitt lag die Ausbeute an GesamtRNA etwa bei 1 - 1.5 mg pro 10^8 Zellen, bei einer Hemmung mit Cycloheximid war sie etwas geringer.

2. Translation von GesamtRNA-Proben:

2.1. Das in vitro Translationssystem:

Für eine in vitro Translation von eukaryotischen mRNAs werden im allgemeinen das Retikulozytenlysat von Kaninchen und das Weizenkeimlysat (neben Hefe-Extrakten und Frosch-Oocyten) bevorzugt verwendet, weil beide ohne größeren Aufwand im Labor hergestellt werden können, oder aber kommerziell erhältlich sind. Für die Translation der HVS-RNAs wurde ein Retikulozytenlysat benutzt, das im Labor aus dem Blut von anämisch gemachten Kaninchen gewonnen wurde (siehe Material und Methoden). Versuche mit einem kommerziellen Weizenkeimsystem ergaben kein verbessertes Spektrum an Translationsprodukten, vielmehr waren die größeren Proteine (über 80 kDa) stark unterrepräsentiert, die größten viralen (ca 150 kDa) gar nicht vorhanden. Hefe-Extrakt und Oocyten-System wurden nicht getestet. Ein kommerzielles Retikulozytenlysat (NEN), das in den ersten Translationsexperimenten benutzt wurde, war dem selbst präparierten qualitativ nicht überlegen. Deshalb wurde in den im folgenden beschriebenen Versuchen nur das eigene Retikulozytenlysat verwendet. Dieses war als Rohlysat (vor dem Nuclease-Verdau) in 1ml-Alliquots portioniert und über flüssigem Stickstoff gelagert worden. Je 3 - 5 ml wurden in einem Ansatz aufgetaut, mit Micrococcus-Nuclease behandelt, um die internen RNAs abzubauen, dann in 100-300µl-Proben abgefüllt und wieder tiefgefroren. Danach wurde ein Lysat-Alliquot nur noch einmal aufgetaut, wenn es in der Translation eingesetzt wurde.

Nochmaliges Einfrieren von Lysatresten verminderte die Translationsleistung zu stark. Das Rohlysat konnte über mehr als 3 Jahre hinweg ohne Aktivitätsverlust über flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Die Zusammensetzung der Translationsansätze, bei denen sowohl GesamtrNAs als auch hybrid-selektierte mRNAs (s. u.) eingesetzt wurden, ist in Material und Methoden beschrieben. Zur Markierung der Translationsprodukte wurde ^{35}S -Methionin ($>800\text{ Ci/mmol}$, Amersham) zugegeben. Eine versuchsweise Markierung mit radioaktivem Cystein ergab keine Verbesserung der Resultate mit ^{35}S -Methionin.

Die Analyse der Translationsprodukte erfolgte stets durch eine Auftrennung auf SDS-Polyacrylamidgelen, entweder direkt oder nach vorhergehender Immunpräzipitation. Die getrockneten Gele wurden mit einem für ^{35}S sensitiven Film exponiert. Immunoblotting von Polyacrylamidgelen wurde nicht durchgeführt, da keine geeigneten Antiseren zur Verfügung standen.

2.2. Translation von GesamtrNAs ohne Immunpräzipitation:

Das Ergebnis einer *in vitro* Translation von GesamtrNAs aus den mit Herpesvirus saimri infizierten und aus nicht infizierten OMK-Zellen ist in Abb. 4 gezeigt. Den Translationsprodukten von RNAs aus nicht infizierten Zellen (A) wurden Polypeptide von RNAs aus infizierten Zellen 20 Std (B), 25 Std (C) und 30 Std (D) gegenübergestellt. Außerdem wurde frühe RNA aus PAA-behandelten infizierten Zellen translatiert (E). Die *in vitro* Translation im Retikulozytenlysat erbrachte Polypeptidprodukte im Molekulargewichtsbereich bis über 150 kDa, wobei die Intensität der Banden auf dem Gel bei den Proteinen von höherem Molekulargewicht nur wenig geringer ist gegenüber den kleinen Proteinen. Dies beweist die Effizienz des Translationssystems, d.h. von der Größe her können bei dieser Form der *in vitro* Translation nahezu alle virusinduzierten Proteine erfaßt werden.

Die virusspezifischen Polypeptide konnten durch Vergleich von infizierten und nicht infizierten Zellen identifiziert werden. Sie sind in der Abb. mit einem Pfeil und dem jeweiligen Molekulargewicht, das anhand einer Eichkurve von 6 Marker-Proteinen (siehe Material und Methoden) errechnet wurde, gekennzeichnet. Zelluläre Background-Proteinbanden vor allem im mittleren Bereich zwischen 40 und 70 kDa verhinderten die Identifikation von viralen Proteinen, deren mRNAs in den Zellen weniger stark produziert werden. Auch vom Retikulozytenlysat selbst kommen Background-Banden hinzu, da die interne RNA nie vollständig von der Micrococcus-Nuclease abgebaut werden kann. In erster Linie wurden mehrere

späte Proteine zwischen 18 und 36 kDa, 45 kDa und 50 kDa sowie größere Produkte von 97, 115 - 152 kDa entdeckt, wovon die meisten sich später als strukturelle Proteine des Virus erwiesen (z.B. 25 kDa, 36 kDa, 97 kDa, 146 kDa und 152 kDa; s. u.). Die Background-Banden nahmen in den späteren Infektionsphasen etwas ab (C, D), da die Synthese zellulärer Produkte durch die fortschreitende Virusinfektion beeinträchtigt wird. Die Zugabe von PAA bei der Infektion führte nur zur Produktion von wenigen virusspezifischen Genprodukten, soweit diese vor dem zellulären Hintergrund zu erkennen waren. Eindeutig identifiziert werden konnten nur die Proteine von 31 kDa, 50 kDa und 115 kDa, welche bei einer Repression der viralen DNA-Polymerase nicht gehemmt werden.

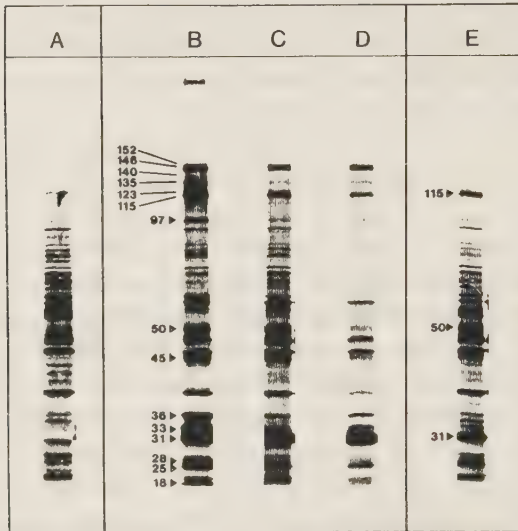


Abb. 4: *In vitro* Translation von GesamtRNA-Proben aus infizierten OMK-Zellen

GesamtRNA wurde aus den Zellen extrahiert nach der Guanidinthiocyanat-Methode und *in vitro* translatiert mit einem Retikulozytenlysat unter Verwendung von ^{35}S -Methionin zur radioaktiven Markierung. Die Translationsprodukte wurden anschließend auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

A = uninfizierte OMK-Zellen

B = OMK-Zellen infiziert mit HVS Stamm 11, RNA extrahiert nach 20 Std

C = infizierte OMK-Zellen, RNA nach 25 Std extrahiert

D = infizierte OMK-Zellen, RNA nach 30 Std extrahiert

E = infizierte und mit PAA behandelte OMK-Zellen, RNA nach 15 Std extrahiert

Virus-induzierte Polypeptide sind mit einem Pfeil und dem Molekulargewicht in kDa gekennzeichnet.

2.3. Translation und Immunopräzipitation mit HVS-spezifischen Kaninchen- und Affenserum:

Zur besseren Charakterisierung der viralen Genprodukte wurde versucht, mit spezifischen Antiseren aus Kaninchen die betreffenden Virusproteine aus den Translationsansätzen heraus zu präzipitieren und damit den zellulären Background zu reduzieren. Es wurden insgesamt 5 Seren verwendet, die in der Arbeitsgruppe produziert worden waren bzw. von R. Honess und Mitarbeitern (Medical Research Council, London) zur Verfügung gestellt wurden:

(1) ein Poolserum aus 3 Kaninchen, die mit gereinigten Viruspartikeln immunisiert worden waren (= R1-Serum; MODROW 1983)

(2) ein Serum gegen HVS-Induzierte Proteine, das durch Inokulation eines Proteinextrakts aus mit dem Stamm 11 infizierten OMK-Zellen erzeugt worden war (= antil1-o)

(3) ein Serum, das durch Inokulation eines Proteinextrakts aus mit Stamm 11att infizierten MAK-Zellen (Nierenepithelzellen von Makaken) erzeugt worden war (=antil1att/MAK)

(4) ein Serum gegen die virusinduzierten DNA-bindenden Proteine (=antiDBP)

(5) ein monospezifisches Serum gegen die viruskodierte Thymidylat-Synthase (=antiTS)

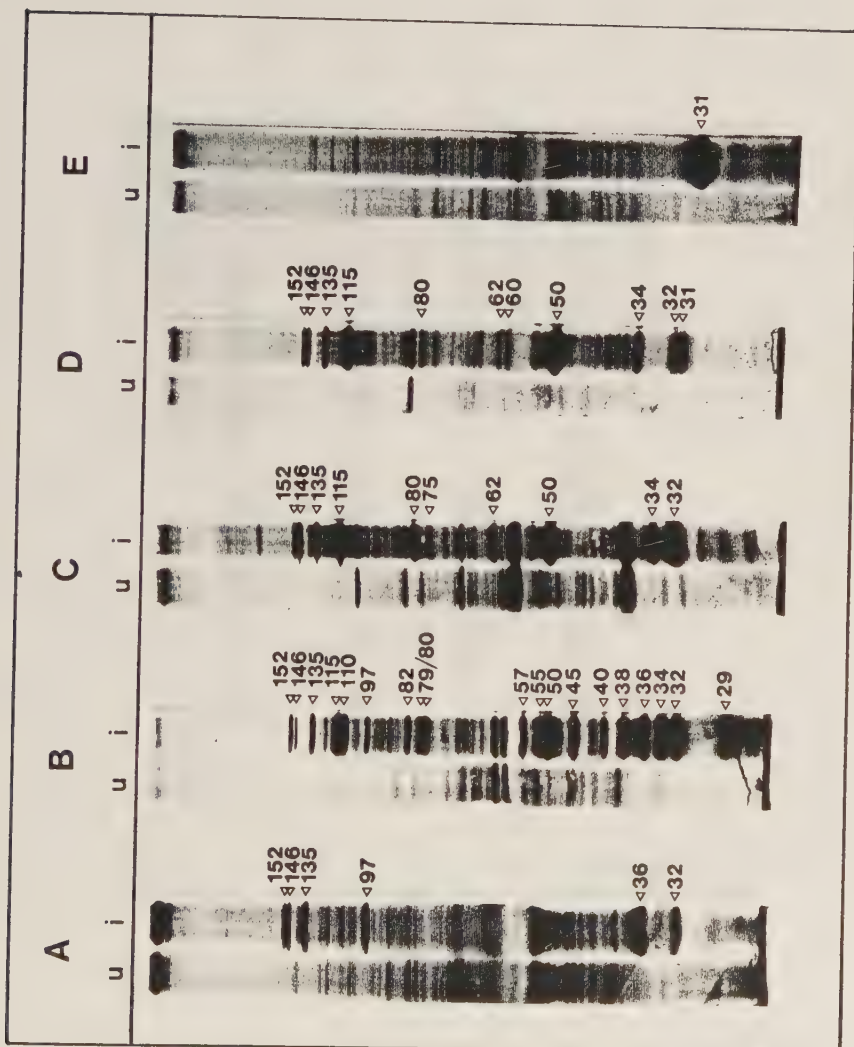
In vitro Translation von GesamtRNAs aus infizierten und uninfizierten OMK-Zellen mit anschließender Immunpräzipitation unter Verwendung der genannten Seren ist in Abb. 5 dargestellt. Mit Hilfe der Seren, vor allem antil1-o und antil1att/MAK, wurden die virusspezifischen Polypeptide wesentlich besser erkannt, besonders die kleinen und mittelgroßen. Das gegen Viruspartikel gerichtete R1-Serum präzipitierte vor allem die strukturellen Proteine (32 kDa, 36 kDa, 97 kDa, 135 kDa, 146 kDa und 152 kDa), die beiden gegen virusinfizierte Zellen gerichteten Seren (antil1-o und antil1att/MAK) erfassen nahezu das gesamte Spektrum der viralen Polypeptide mit einigen qualitativen und quantitativen Unterschieden. Das Serum gegen die DNA-bindenden Proteine reagierte gegen die von E. Blair et al. (1983) beschriebenen Virusproteine wie z.B. 50 kDa und 115 kDa, aber auch gegen weitere Produkte, deren Rolle bzw. deren Fähigkeit, DNA zu binden, bisher noch nicht geklärt werden konnte. Bei dem 5. Serum ergaben sich ebenfalls unspezifische Reaktionen, aber vor diesem Background war die Thymidylat-Synthase (31 kDa) eindeutig dominierend.

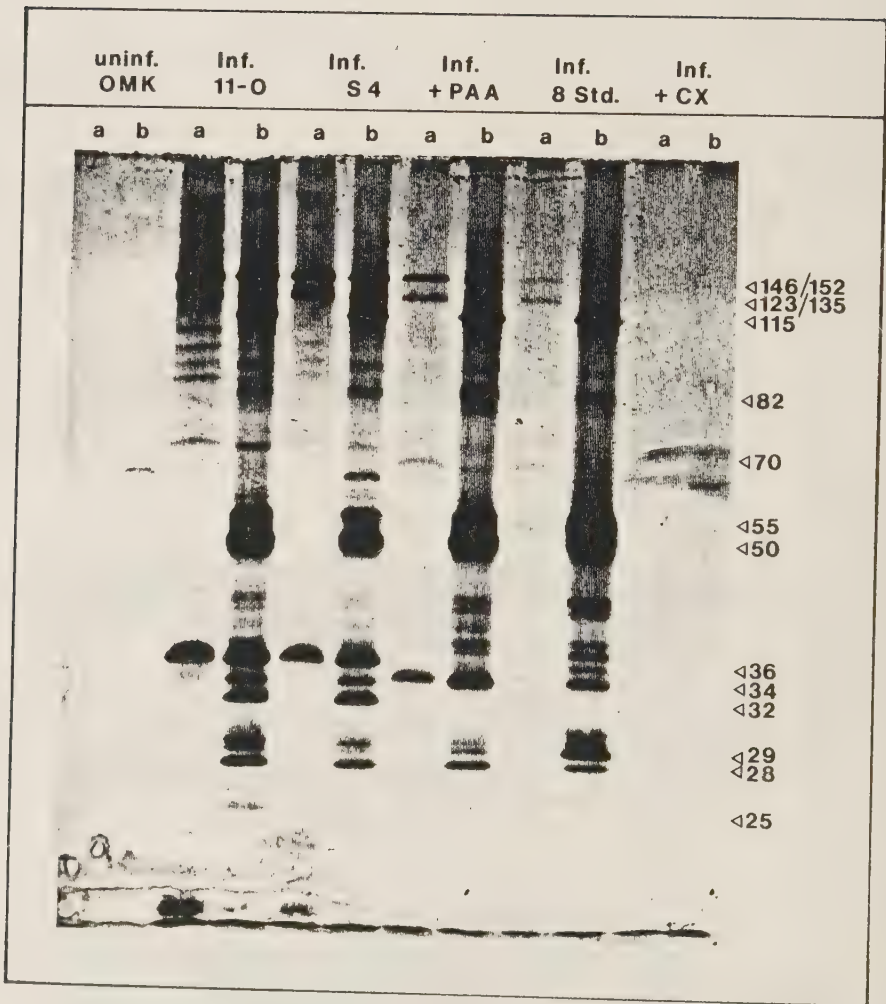
Abb. 5 (nächste Seite): Immunpräzipitation der *in vitro* Translationsprodukte mit verschiedenen HVS-spezifischen Antiseren

GesamtRNAs aus uninfizierten (u) und HVS-infizierten (i) OMK-Zellen (Extraktion 20 Std nach Infektion) wurden *in vitro* translatiert und danach mit 5 verschiedenen Antiseren inkubiert: (A) = R1-Serum; (B) = antill-o-Serum; (C) = antillatt/MAK-Serum; (D) = antiDBP-Serum; (E) = antiTS-Serum (Beschreibung der Seren siehe Text). Die Immunpräzipitate wurden mit Sepharose-Protein-A-beads extrahiert, gewaschen, von den Beads abgetrennt und auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Abb. 6 (übernächste Seite): Zeitliche Abfolge der Synthese viraler Produkte

RNAs aus (v. l. n. r.) uninfizierten OMK-Zellen, mit HVS 11 infizierten OMK-Zellen (20 Std nach Infektion), mit HVS S4 infizierten OMK-Zellen (20 Std nach Infektion), mit HVS 11 infizierten, PAA-behandelten OMK-Zellen, HVS-11-infizierten OMK-Zellen nach 8 Std und HVS-11-infizierten, mit Cycloheximid behandelten OMK-Zellen wurden *in vitro* translatiert. Die Translationsansätze wurden anschließend mit R1-Serum (a) bzw. mit antill-o-Serum (b) immunpräzipitiert (die Seren waren mit einem Proteinextrakt aus uninfizierten OMK-Zellen vorinkubiert worden).



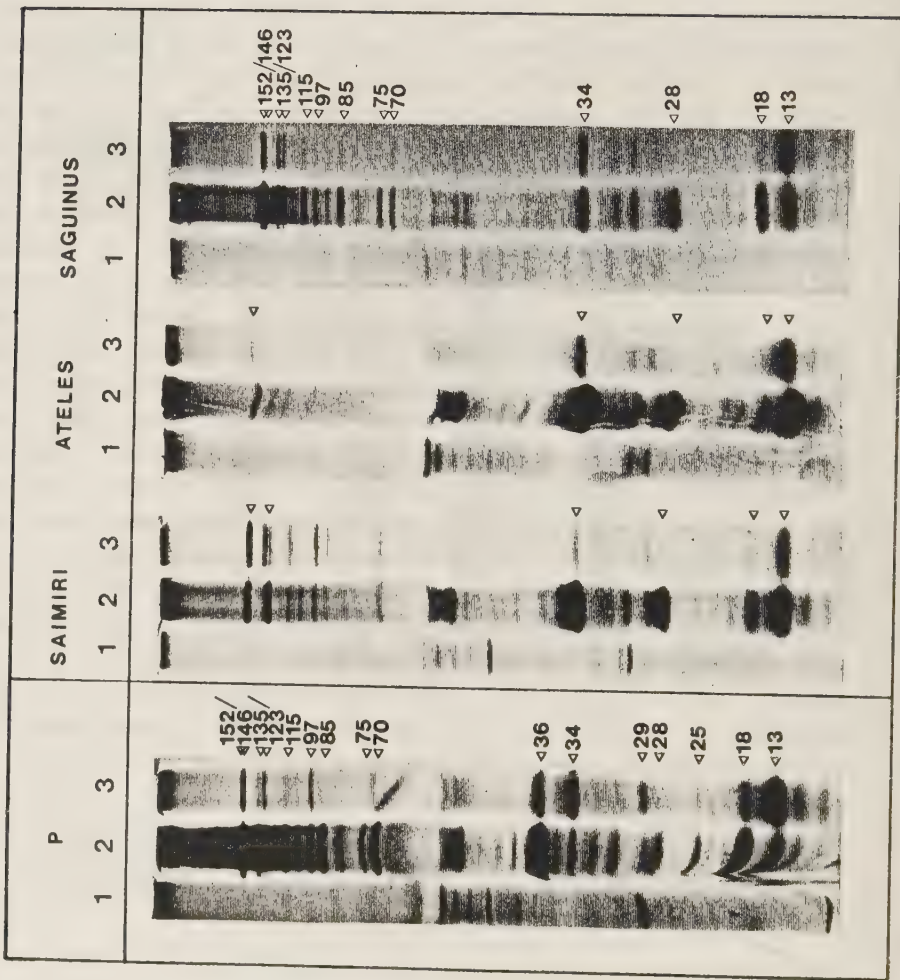


Das R1- sowie das anti11-o-Serum wurden benutzt, um die zeitliche Abfolge der Synthese viraler Produkte zu analysieren (Abb. 6). RNAs aus (1) uninfizierten Zellen, (2) mit Herpesvirus saimiri Stamm 11 infizierten Zellen, (3) mit der Virusmutante S4 infizierten Zellen, (4) mit Stamm 11 infizierten und PAA-behandelten Zellen, (5) mit Stamm 11 infizierten Zellen nach 8 Std und (6) mit Stamm 11 infizierten und Cycloheximid-behandelten Zellen wurden in vitro translatiert und dann immunpräzipitiert (die Seren waren hier zusätzlich mit einem Proteinextrakt aus uninfizierten OMK-Zellen vorinkubiert worden). Dabei konnte gezeigt werden, daß einige Proteine bereits sehr früh entstehen (28 kDa, 29 kDa, 34 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 82 kDa und 115 kDa), die als solche ohne Immunpräzipitation nicht alle zu identifizieren waren (siehe 2.2.). Die Synthese von 135 kDa und 152 kDa startet ebenfalls schon früh, ist aber in den späteren Phasen wesentlich gesteigert, wohingegen z.B. Proteine mit den Molekulargewichten 29 kDa, 34 kDa und 82 kDa in den frühen Stadien des Infektionszyklus maximal synthetisiert werden. Andere Proteine (50 kDa, 55 kDa und 115 kDa) werden von einem frühen Zeitpunkt an gleichbleibend stark produziert. 25 kDa und 36 kDa sind späte strukturelle Proteine, was ihre Immunpräzipitation durch das R1-Serum beweist. Das 25-kDa-Protein fehlte bei der Virusmutante S4, da dieses Protein in einem Bereich des Genoms kodiert, der bei S4 deletiert ist (s. u.). Unter Cycloheximid-Bedingungen konnten in diesem Experiment keine immunpräzipitierbaren viralen Proteine entdeckt werden.

In einem weiteren Experiment wurden Antiseren aus infizierten Affen zur Immunpräzipitation von HVS-Proteinen benutzt (Abb. 7). Ein Serum aus einem gesunden, anti-HVS-positiven Totenkopffäffchen (Saimiri) sowie zwei Seren aus infizierten und tumortragenden Tieren der Gattungen Ateles (Klammeraffen) und Saguinus (Krallenaffen) wurden verglichen mit dem R1-Serum aus Kaninchen. Alle drei Affenserum reagierten gegen (späte) virale Proteine, wobei vor allem die 13-, 18-, 28- und 34-kDa-Proteine sowie die großen 135-, 146- und 152-kDa-Produkte dominierten. Antikörper gegen 25 kDa und 36 kDa schienen nicht vorhanden zu sein, obwohl diese ebenfalls zu den dominanten Strukturproteinen zählen.

Abb. 7 (nächste Seite): Immunpräzipitation mit Affenserum

Die in vitro Translationsansätze von RNAs aus uninfizierten OMK-Zellen (1), aus HVS-infizierten Zellen 20 Std nach Infektion (2) und aus HVS-infizierten und PAA-behandelten Zellen (3) wurden mit 3 verschiedenen Affenserum (SAIMIRI, ATELES, SAGUINUS, siehe Text) sowie zum Vergleich mit einem Serumpool aus den Kaninchenserum R1 und anti11-o immunpräzipitiert und auf 15%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Virus-spezifische Polypeptide sind mit offenen Pfeilen gekennzeichnet.



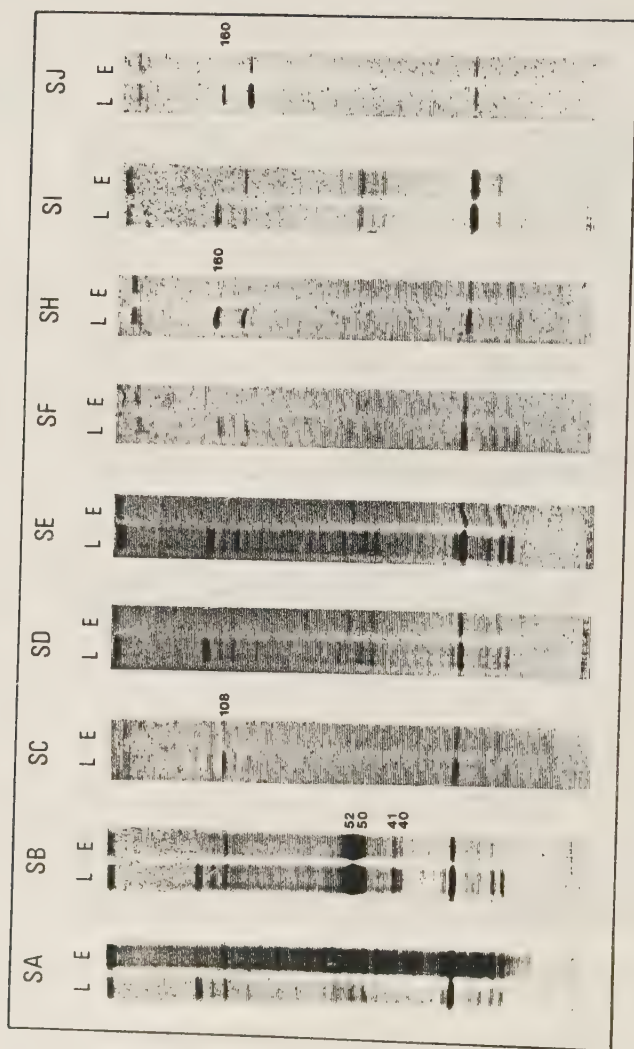
Insgesamt wurden weniger Proteine präzipitiert als mit den Kaninchenserum. Eine Differenz im Ergebnis der Immunpräzipitation zwischen dem gesunden Totenkopffäffchen und den beiden tumortragenden Tieren ließ sich anhand dieses Experiments nicht erkennen. Der Antikörperspiegel wird demnach in allen drei Fällen durch gleichartige Neuproduktion von Viruspartikeln hervorgerufen, und eine Tumorentstehung mit daran beteiligten Virusfaktoren wird durch die Antiseren offenbar nicht reflektiert.

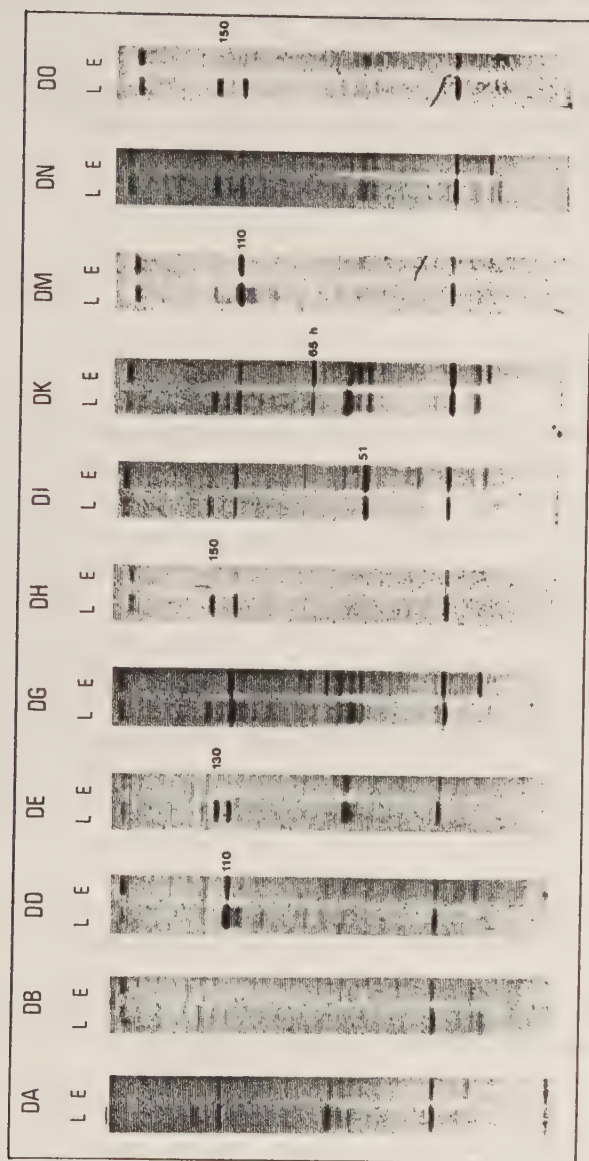
2.4. Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern:

Ein weiteres Hilfsmittel zur Identifikation der viralen Proteine sind neben den Antiseren auch monoklonale Antikörper. Ein Satz von mehreren verschiedenen monoklonalen Antikörpern, die gegen z.T. unterschiedliche HVS-spezifische Proteine gerichtet sind, wurde von R. Randall und R. Honess entwickelt (RANDALL et al. 1984a) und stand für eine Charakterisierung der *in vitro* Translationsprodukte zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 gezeigt, wobei frühe RNAs (E) und späte RNAs (L) translatiert wurden und die Ansätze hinterher mit den die entsprechenden monoklonale Antikörper enthaltenden Ascitesflüssigkeiten inkubiert wurden (die Molekulargewichte sind hier nach den Angaben von R. Randall und Mitarbeitern eingetragen). Nicht alle monoklonale Antikörper, die *in vivo* virusspezifische Proteine erkannten, präzipitierten auch *in vitro* Translationsprodukte (z.B. die monoklonalen Antikörper SA, SD, SE, SF, SI, DA, DB, DG und DN). Dies lag meist daran, daß die Antikörper gegen Glykoproteine und dabei offensichtlich gegen den Kohlehydrat-Anteil gerichtet waren (SD, SE, SF), oder die *in vitro* unmodifizierten Produkte erreichten nicht die erforderliche Konformation wie in der infizierten Zelle. Die besten Reaktionen wurden mit den verschiedenen Antikörpern gegen das frühe 110-kDa-Protein erzielt (DD, DM), sowie mit den Antikörpern SB (gegen 52/50 kDa) und DI (gegen 51 kDa).

Abb. 8 (auf den nächsten Seiten): Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern

Späte (=L; 20 Std nach Infektion) und frühe (=E; aus FAA-inhibierten Zellen) GesamtRNAs aus HVS-infizierten OMK-Zellen wurden *in vitro* translatiert, und die Ansätze hinterher jeweils mit 3 µl Ascitesflüssigkeit inkubiert, die einen von 20 monoklonalen Antikörpern (SA - SJ und DA - DO) enthielt. Die Immunkomplexe wurden wiederum mit Sepharose-Protein-A-beads gereinigt. Die Präzipitate wurden auf 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. HVS-spezifische Polypeptide sind mit den Molekulargewichten in kDa (Angaben nach RANDALL et al. 1984) gekennzeichnet.





Auch die großen späten Proteine von 108 kDa (SC), 130 kDa (DE), 150 kDa (DH, DO) und 160 kDa (SH, SJ) wurden erkannt, wobei 150 kDa nur schwach von DH und DO, dagegen überhaupt nicht von DB präzipitiert wurde. Der Antikörper DK präzipitierte ein zelluläres Produkt von 65 kDa. Bei SB werden in vivo Proteine von 77/76 und 86 kDa kopräzipitiert, wahrscheinlich sind sie mit dem 52-kDa-Protein in den Zellen komplexiert, während bei der in vitro Translation ein solcher Komplex nicht gebildet wird.

3. Translation von hybrid-selektierten mRNAs:

3.1. Translation ohne Immunpräzipitation:

Nachdem durch in vitro Translation von GesamtrNAs aus infizierten Zellen ein Großteil der von Herpesvirus saimiri induzierten Polypeptide untersucht worden war, sollten diese durch Hybrid-Selektion von mRNAs mit Fragmenten des Virusgenoms den entsprechenden kodierenden Regionen zugeordnet werden. Für eine solche Kartierung standen plasmidklonierte Restriktionsfragmente des gesamten M-Anteils des Genoms von Herpesvirus saimiri zur Verfügung (KNUST et al. 1983b; siehe Abb. 3). Die repetitive H-DNA wurde diesbezüglich nicht untersucht, da frühere Publikationen keine Genexpression in diesem Bereich erwarten ließen (TRACY und DESROSIERS 1980; BANKIER et al. 1985). Über CsCl-Gradienten gereinigte Plasmid-DNA wurde auf Nitrocellulose-Filter gebunden und dann gegen GesamtRNA-Proben unter relativ stringenten Bedingungen (die Hybridisierungstemperatur entsprach $T_m - 15^\circ\text{C}$) hybridisiert. Die selektierten mRNAs wurden eluiert, mit Ethanol gefällt und in sterilem bidest. Wasser aufgenommen. Die in vitro Translation von hybrid-selektierten späten RNAs ist in Abb. 9 dargestellt. Die virusspezifischen Proteinbanden sind mit Pfeilen und dem Molekulargewicht gekennzeichnet. Wegen des unvollständigen Verdauers der lysat-internen RNAs sind noch einige Background-Banden gleichmäßig in allen Spuren vorhanden und können zum Teil Virusproteine überdecken. Hingegen sind durch die Hybrid-Selektion alle zellulären Produkte verschwunden.

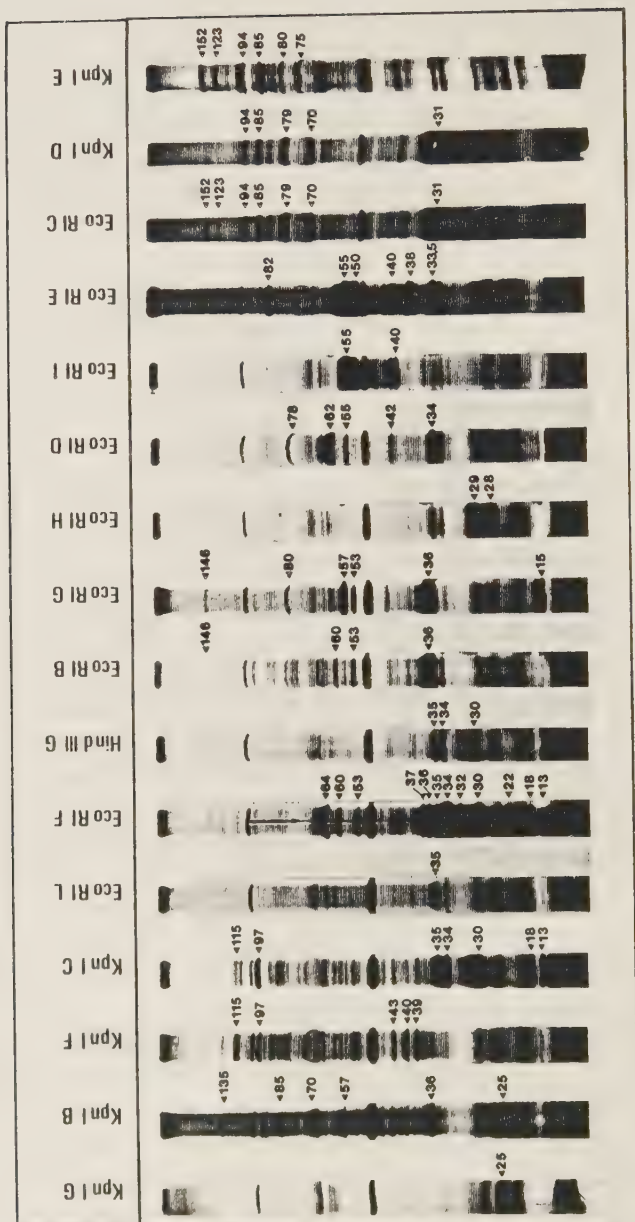
Etwa 50 virusspezifische Polypeptide im Molekulargewichtsbereich zwischen 10 und 160 kDa konnten mit dieser Methode entdeckt und mit den kodierenden Genomregionen korreliert werden. Damit lag die Zahl über derjenigen der Virusprodukte, die aus einer Translation von GesamtRNA heraus identifiziert wurden. Es kommt hinzu, daß Doppelbanden (z.B.

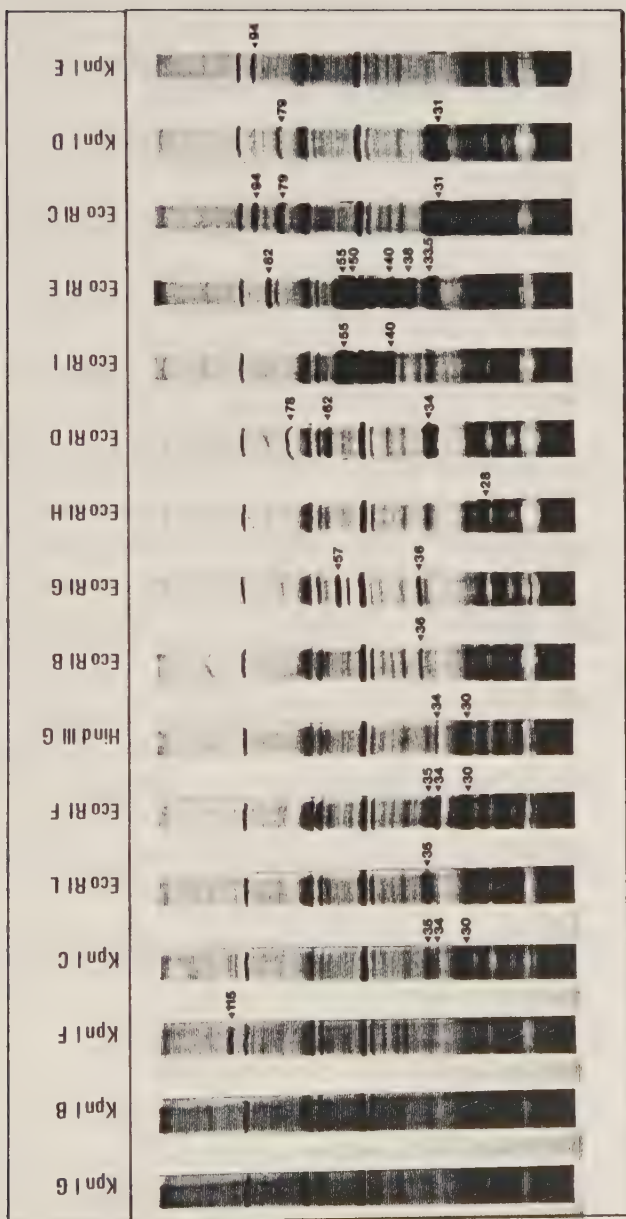
Abb. 9 (nächste Seite): *In vitro* Translation von hybrid-selektierten mRNAs (späte RNA)

Plasmid-klonierte Genomfragmente von Herpesvirus saimiri wurden auf kleine Nitrocellulose-Filter gebunden und gegen RNA-Proben aus infizierten OMK-Zellen (20 Std nach Infektion) hybridisiert. Die hybridisierten RNAs wurden von den Filtern eluiert und Ethanol-gefällt. Diese so selektierten mRNAs wurden *in vitro* translatiert, die Translationsprodukte auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Auf der Abbildung sind die Fragmente von links nach rechts in der Reihenfolge wie auf dem HVS-11-Genom aufgetragen (vgl. dazu Abb. 3). Die virus-spezifischen Polypeptide sind mit Pfeilen und den Molekulargewichten in kDa gekennzeichnet.

Abb. 10 (übernächste Seite): *In vitro* Translation von frühen hybrid-selektierten mRNAs

Die gleichen Genomfragmente wie in Abb. 9 wurden benutzt, um frühe RNAs (aus PAA-behandelten infizierten Zellen) durch Hybrid-Selektion anzureichern. Das Ergebnis der *in vitro* Translation dieser mRNAs nach Auftrennung auf SDS-Polyacrylamidgelen ist in der Abbildung gezeigt.





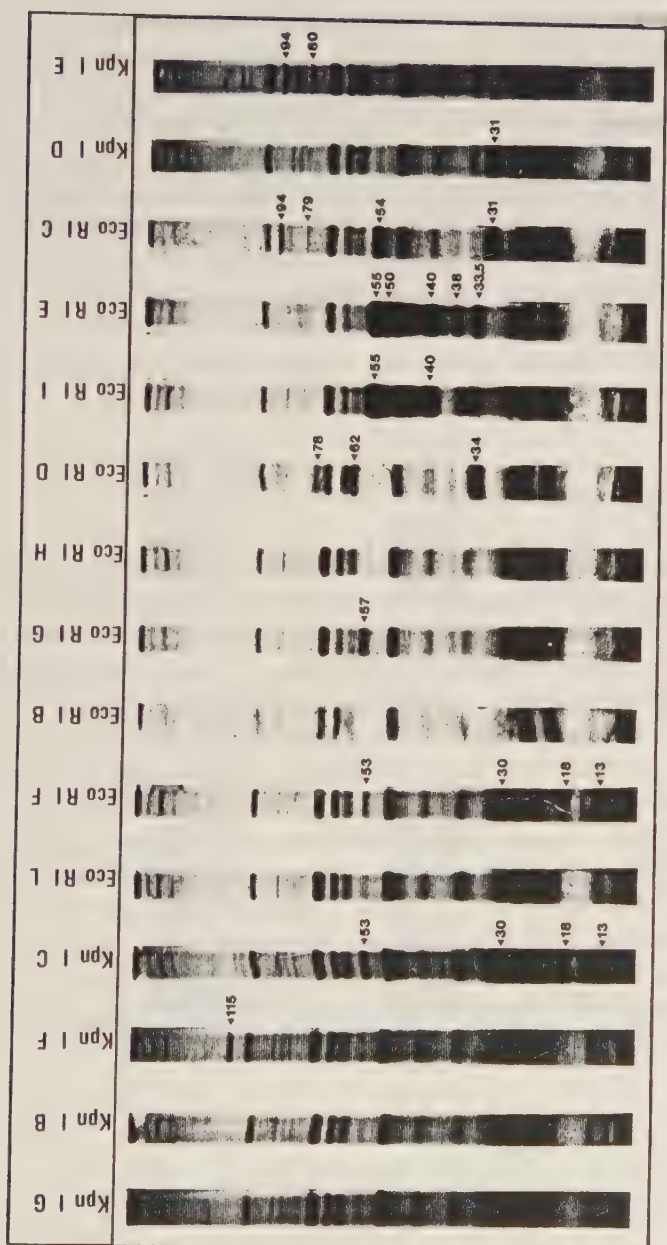
115/123 kDa, 146/152 kDa) getrennt wurden und damit eindeutig als zwei unabhängige Proteine gesehen werden konnten. Abgesehen davon wurden in vielen Fällen durch den Anreicherungsseffekt bei der Hybrid-Selektion stärkere Signale erhalten. Die kodierenden Regionen zu diesen späten Polypeptiden verteilen sich über die gesamte M-DNA, Abschnitte mit spezifischer Expression von "späten" Genen wurden nicht gefunden. Die Intensität der Proteinbanden nahm bei den großen Proteinen im Durchschnitt etwas ab, was durch die höhere Instabilität von langen mRNAs im gesamten Prozeß der Hybridisierung und Translation zu erklären ist. Eine längere Hybridisierungsdauer als 2 - 2 1/2 Std führte dazu, daß gerade die großen Proteine noch schlechter translatiert wurden. Am genauesten war die Identifikation der Proteine, wenn sie durch Überlappung von Fragmenten oder bei benachbarten Fragmenten mehrfach bestätigt werden konnte.

Abb. 10 zeigt das Ergebnis der Translation von hybrid-selektierten mRNAs, bei der von früher GesamtRNA (unter PAA-Hemmung) ausgegangen wurde, d.h. es sind hier nur noch diejenigen Produkte zu finden, deren Expression unabhängig von einer Replikation des viralen Genoms verläuft. Insgesamt wurde etwa die Hälfte aller bereits identifizierten Polypeptide damit als frühe Genprodukte klassifiziert. Eindeutig abgegrenzte Regionen früher Genexpression wurden nicht gefunden, es dominierte vielleicht etwas das rechte Drittel des M-Genoms von den Fragmenten EcoRI D - EcoRI C. Einige große Proteine (135 kDa, 146 kDa, 123 u. 152 kDa) fehlten in der frühen Phase. Dies entspricht den *in vivo* Untersuchungen (MODROW 1983) sowie dem Ergebnis aus der Translation von GesamtRNA (siehe Abb. 4), betroffen sind hierbei die strukturellen Proteine. Dagegen wurden 31 kDa und 55 kDa (Fragmente EcoRI C/KpnI D bzw. EcoRI I/E) besonders stark exprimiert.

Die Tatsache, daß alle hier gefundenen frühen Proteine auch noch in der späten Phase vorhanden sind, ist mit der schlechten Synchronisation des Infektionsverlaufs in den OMK-Monolayern zu erklären (RANDALL et al. 1985). Eine Untersuchung von noch späteren Phasen (>30 Std), in denen die Expression der frühen Gene schon weitestgehend abgeschaltet ist, ist in dieser Form wegen des dann vorhandenen CPE nicht gut machbar.

Abb. 11 (nächste Seite): Translation hybrid-selektierter mRNAs aus infizierten Zellen 10 Std nach Infektion

*GesamtRNA wurde aus infizierten OMK-Zellen bereits 10 Std nach der Infektion (ohne PAA-Behandlung) extrahiert und die viralen mRNAs durch Hybrid-Selektion angereichert. Die Produkte der *in vitro* Translation dieser hybrid-selektierten frühen mRNAs wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.*



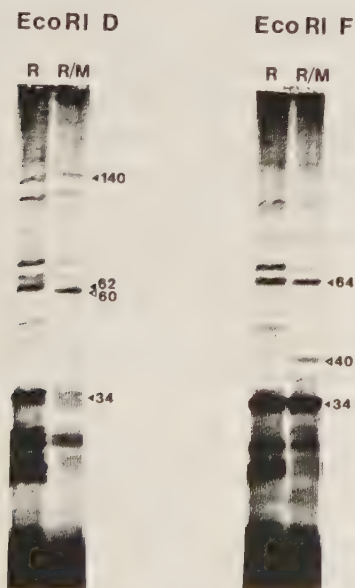
Die Definition der "frühen" Gene bzw. Genprodukte ist eine funktionelle und bezieht sich alleine auf ihre Produzierbarkeit bei gleichzeitiger Hemmung der viralen DNA-Polymerase. Um dagegen den zeitlichen Verlauf in den frühen Phasen der Virusreplikation zu dokumentieren, wurde eine Hybrid-Selektion mit RNA aus infizierten Zellen nur 10 Std nach Infektion durchgeführt (Abb. 11). Dabei ergab sich ein leicht verändertes Bild im Vergleich mit dem vorigen Ergebnis. Die Mehrzahl der gefundenen Genprodukte blieb gleich, auch was die Intensität der Banden anbelangte. Bei dem 53-kDa-Protein (KpnI C, EcoRI F) und dem 80-kDa-Protein (KpnI E) ist die Synthese bei PAA gehemmt, ohne PAA-Behandlung werden beide schon früh produziert. Dagegen konnten die Proteine mit 34 kDa (EcoRI F), 35 kDa (EcoRI L/F, KpnI C), 79 kDa (EcoRI C) und 82 kDa (EcoRI E) als "früh" eingestuft werden, vom zeitlichen Ablauf her gesehen startet ihre Synthese jedoch später als 10 Std nach Infektionsbeginn.

3.2. Processing:

In einem zusätzlichen Translationsexperiment sollte untersucht werden, ob durch Zugabe von mikrosomalen Membranen *in vitro* ein Prozessieren von viralen Polypeptiden erreicht werden kann. Dazu wurden wiederum hybrid-selektierte mRNAs *in vitro* translatiert unter Zusatz eines Membranpräparats aus Hundepankreas (Amersham). Gegenüber den vorhergehenden Resultaten wurden nur bei zwei Genomfragmenten Veränderungen beobachtet (Abb. 12). Bei dem Fragment EcoRI D wurde statt des 62-kDa-Produktes ein Protein von nur noch 60 kDa synthetisiert, was als Abspaltung eines Signalpeptides interpretiert werden kann. Im EcoRI-F-Stück wurde zusätzlich ein 40-kDa-Protein gefunden, zu dem kein entsprechendes Protein in der Translation ohne Membranen existierte. Vermutlich kann dieses Produkt nur an Membranen synthetisiert werden, während seine Synthese an freien Ribosomen abgestoppt wird. Bei den restlichen Fragmenten wurden bei Zugabe von Membranen keine neuen oder veränderten Translationsprodukte gefunden, auch keine meßbare Größenveränderung durch zusätzliche Glykosylierung.

Abb. 12: In vitro Translation mit Retikulozytenlysat und microsomalen Membranen

Hybrid-selektierte virale mRNAs wurden im Retikulozytenlysat in vitro translatiert unter Zugabe eines Membranpräparats aus Hundepankreas. Die beiden Genomfragmente, bei denen sich Veränderungen in den Translationsprodukten zeigten (EcoRI D und EcoRI F), sind in der Abbildung aufgeführt.



3.3. Translation und Immunpräzipitation mit Kaninchenserum:

Um die bei den vorangegangenen Experimenten aufgetretenen Probleme mit den vom Lysat herrührenden Background-Banden zu umgehen und damit vor allem im unteren Molekulargewichtsbereich (10 - 40 kDa) alle HVS-spezifischen Proteine zu entdecken, wurden die bereits erwähnten Antiseren (siehe 2.3.) zur Immunpräzipitation von Translationsansätzen mit hybrid-selektierten mRNAs eingesetzt. Es wurden dabei nur Hybrid-Selektionen mit später RNA untersucht, da bereits nachgewiesen worden war, daß die frühen Genprodukte auch in der späten Infektionsphase (ca 20 Std nach Infektionsbeginn) noch vorhanden sind. Abb. 13 zeigt die Immunpräzipitation mit einem Pool-Serum aus RI und antiI-o. Der Background aus den Retikulozytenlysat-Banden war beinahe ganz verschwunden, die virusspezifischen Banden wurden entsprechend ihrer jeweiligen Immunogenität sichtbar. Im Bereich unter 30 kDa wurden dadurch zusätzlich gefunden: 27 kDa in Fragment EcoRI D, 28 kDa in KpnI D und EcoRI C, 28,5 kDa in EcoRI B; 28 kDa und 29 kDa in Fragment EcoRI H wurden erst jetzt eindeutig sichtbar. Hinzu kamen 45 kDa in EcoRI E, 83 kDa in KpnI E und 85 kDa in EcoRI D. Andererseits konnten verschiedene Proteine gegenüber der Translation ohne Immunpräzipitation nicht mehr gefunden werden oder waren schwächer (39 kDa, 40 kDa und 43 kDa in KpnI F, 60 kDa in EcoRI F/B, 64 kDa in EcoRI F, 80 kDa in EcoRI G, 42 kDa und 78 kDa in EcoRI D sowie 70 kDa, 79 kDa, 85 kDa und 94 kDa in den Fragmenten EcoRI C bis KpnI E).

Mit dem RI-Serum alleine konnten jetzt die strukturellen Virusproteine separat betrachtet werden, wobei die Einschränkung zu machen ist, daß die Anreicherung von mRNAs über Hybrid-Selektion stets "viralen Background" bei der nachfolgenden Translation mit sich bringt. In Abb. 14 sind einige strukturelle Proteine gekennzeichnet, dazu zählen vor allem die großen 135 kDa, 146 kDa und 152 kDa; das Signal bei den späten Proteinen von 25 kDa, 34 kDa, 36 kDa und 97 kDa war noch verstärkt gegenüber den bisherigen Ergebnissen. Dagegen fanden sich auch andere Proteine (z.B. 31 kDa in EcoRI C / KpnI D, 34 kDa in EcoRI F, 55 kDa in EcoRI I/E), die aufgrund von weiteren Untersuchungen (s. u.) nicht zu den strukturellen Komponenten zu zählen sind. Ihr Vorhandensein ist mit einer unspezifischen Reaktion zu erklären, begünstigt durch die erwähnte Anreicherung ihrer mRNAs.

Ähnliches trifft auch auf das antiDBP-Serum zu (Abb. 15), zusätzlich gilt hierfür noch, daß die Präparation der DNA-bindenden Proteine vor der Inokulation in die Kaninchen keine exakte Abtrennung von den übrigen Proteinen brachte (R.

Honess, pers. Mitteilung). So konnten neben den Proteinen von 115 kDa und 50 kDa, deren DNA-bindende Funktion allein im Experiment nachgewiesen werden konnte (BLAIR et al. 1986), wiederum weitere virusspezifische Polypeptide als Immunpräzipitate gefunden werden. Bei dem 135-kDa-Produkt handelt es sich z.B. um ein basisches Strukturprotein, das unspezifisch an DNA binden kann (R. Honess, pers. Mitteilung), 31 kDa ist die Thymidylat-Synthase, 25 kDa ist ein spätes Strukturprotein, das mit der Oncogenität kausal verknüpft ist (s. u.). Unabhängig von der Frage nach der Funktion und damit abgesehen von etwaiger unspezifischer Reaktion in der Immunpräzipitation bleibt jedoch festzuhalten, daß in allen Fällen mit diesen Antiseren die Existenz der gefundenen Proteine und ihrer kodierenden Regionen bestätigt werden konnte.

Die Reaktion des antiTS-monospezifischen Serums mit den Translationsprodukten von hybrid-selektierten RNAs ist in Abb. 16 zu sehen. Das 31-kDa-Protein, das in EcoRI C / KpnI D kodiert, wurde immunpräzipitiert und zusätzlich einige kleinere Polypeptide in der gleichen Region, vermutlich Bruchstücke aus unvollständiger Translation. Dies bestätigte die Korrelation zwischen dem 31-kDa-Protein und der Funktion als Thymidylat-Synthase (HONESS et al. 1986). Außerdem wurden auch hier unspezifische Reaktionen gefunden, am stärksten war sie bei dem 25-kDa-Produkt in KpnI G/B.

Abb. 13 - 16 (auf den nächsten Seiten): Translation hybrid-selektierter mRNAs mit nachfolgender Immunpräzipitation

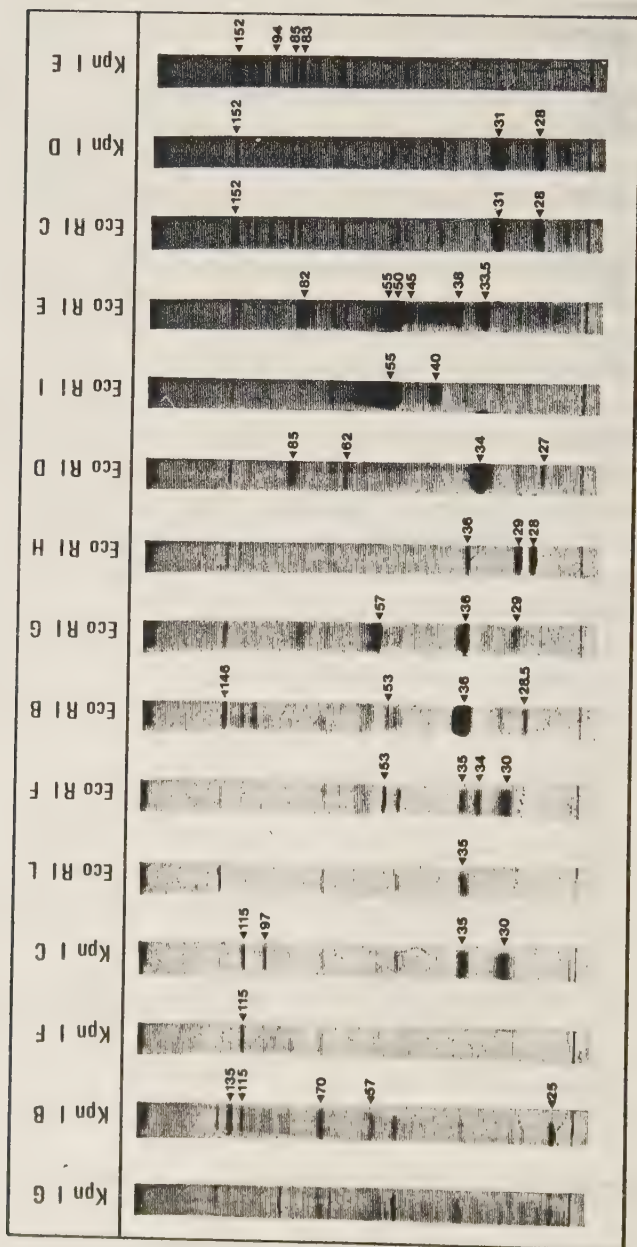
Hybrid-selektierte späte mRNAs wurden in vitro translatiert, die Translationsprodukte wurden mit verschiedenen HVS-spezifischen Kaninchenserum immunpräzipitiert und danach auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

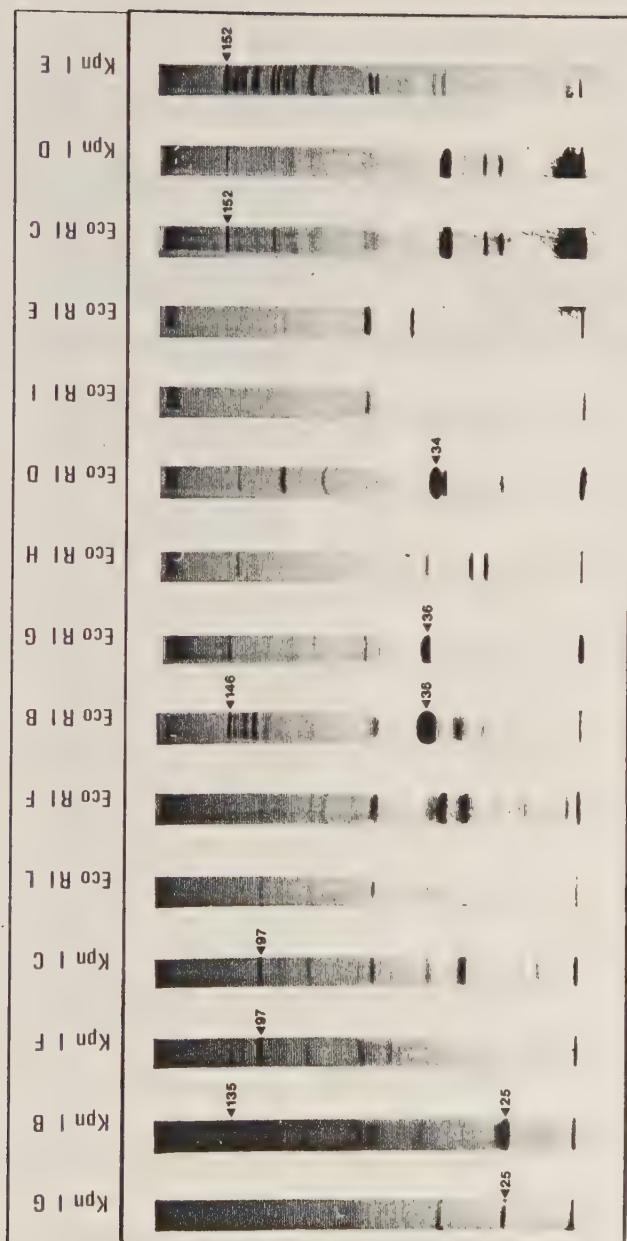
Abb. 13: Immunpräzipitation mit einem Poolserum aus R1- und anti11-0-Serum

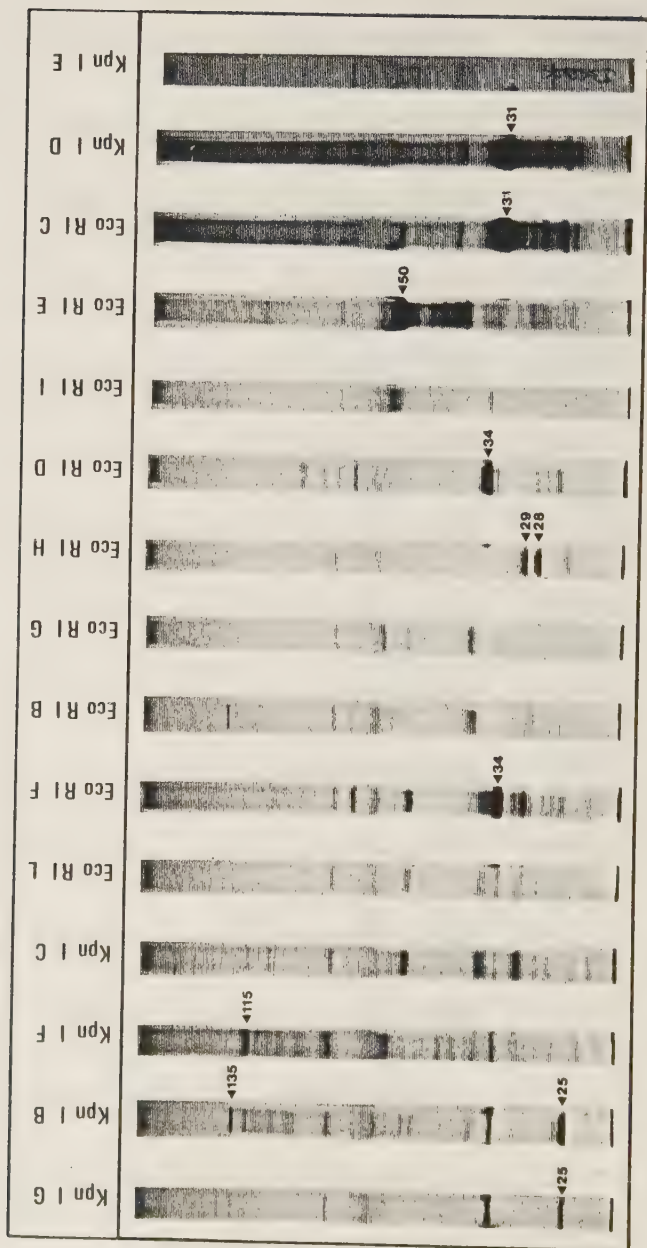
Abb. 14: Immunpräzipitation mit dem R1-Serum (gegen strukturelle HVS-Proteine gerichtet)

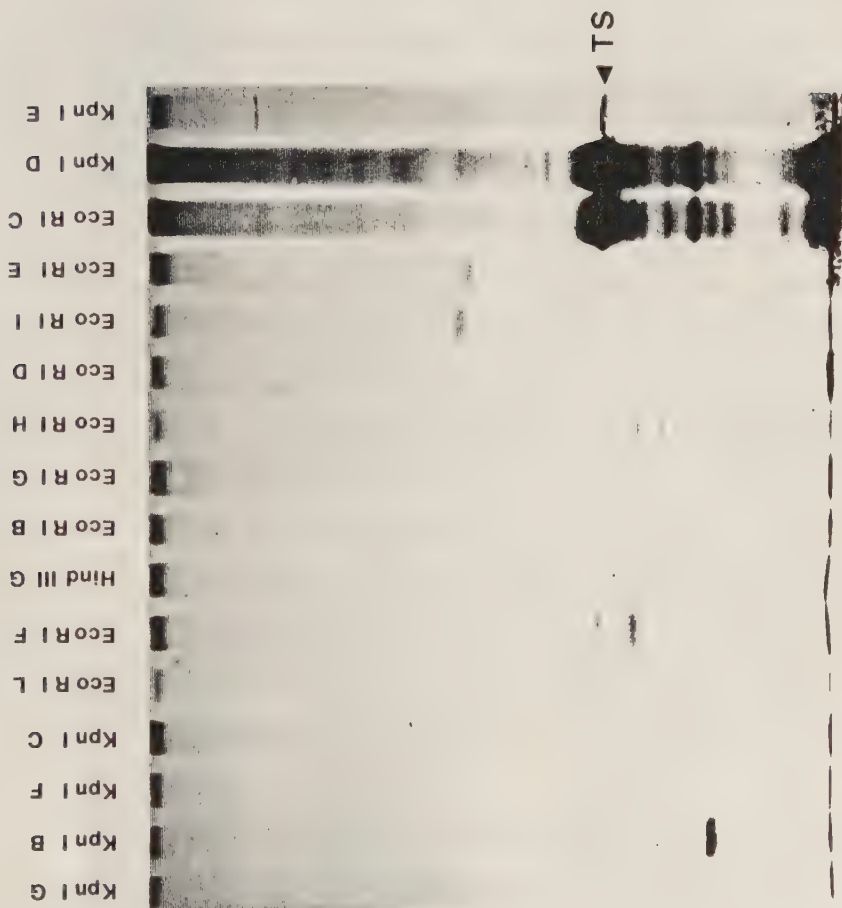
Abb. 15: Immunpräzipitation mit antiDBP-Serum (gegen die viralen DNA-bindenden Proteine gerichtet)

Abb. 16: Immunpräzipitation mit dem monospezifischen Serum gegen die virale Thymidylat-Synthase (antiTS-Serum)









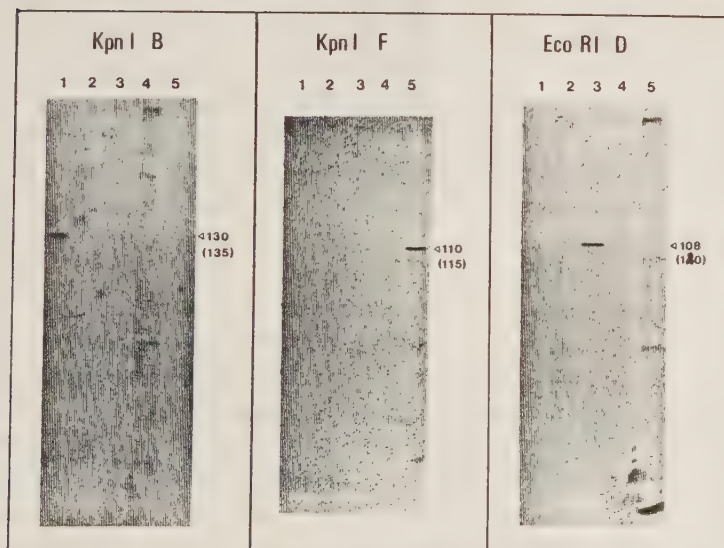
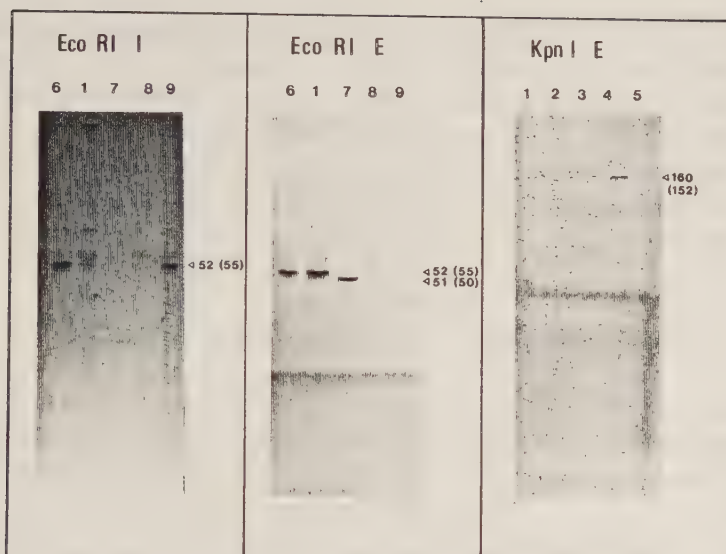
3.4. Translation und Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern:

Neben den Herpesvirus saimiri - spezifischen Antiseren wurden auch die in 2.4. beschriebenen monoklonalen Antikörper zur weiteren Charakterisierung der viralen Genprodukte in der Hybrid-Selektion benutzt. Mit der Immunpräzipitation durch einen monoklonalen Antikörper kann ein in vivo gefundenes Protein mit dem durch in vitro Translation von hybrid-selektierter mRNA kartierten Genombereich, der für dieses Protein kodiert, korreliert werden.

Um die RNA-Proben sparsam einzusetzen, wurden hier nur die monoklonalen Antikörper getestet, bei denen schon in der Translation von GesamtRNAs ein positives Ergebnis erzielt worden war (Abb. 17). Die monoklonalen Antikörper DE (1; für 130 kDa), DH (2; für 150 kDa), SC (3; für 108 kDa), SH (4; für 160 kDa) und DD (5; für 110 kDa) wurden jeweils mit den Translationsansätzen von mRNAs inkubiert, die durch Hybrid-Selektion mit den Fragmenten gewonnen worden waren, auf denen nach den vorhergehenden Ergebnissen große Proteine kodiert sind (KpnI B, KpnI E, KpnI F und EcoRI D). Analog dazu wurden monoklonale Antikörper, die kleine Proteine erkennen, SB (6), DI (7), DG (8) und DK (9), zur Immunpräzipitation von Ansätzen eingesetzt, bei denen kleine Virusproteine synthetisiert werden, d.h. vor allem EcoRI I und EcoRI E. In 6 Fällen konnten hierbei virale Polypeptide von den Antikörpern erkannt werden: DE präzipitierte das 135-kDa-Protein (Molekulargewichte in Klammern entsprechen den Angaben von R. Randall), welches in KpnI B kodiert, das 115-kDa-Produkt in KpnI F wurde von DD erkannt, das 152-kDa-Strukturprotein in KpnI E von SH.

Abb. 17 (nächste Seite): Translation hybrid-selektierter mRNAs und Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern

Mit 6 ausgewählten Genomfragmenten (siehe Text) wurden späte RNAs aus infizierten OMK-Zellen hybridisiert, die selektierten mRNAs in vitro translatiert. Die Translationsansätze wurden mit 9 verschiedenen monoklonalen Antikörpern (1 = DE, 2 = DH, 3 = SC, 4 = SH, 5 = DD, 6 = SB, 7 = DI, 8 = DG, 9 = DK; vgl. Abb. 8) inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Molekulargewichte sind nach RANDALL et al. (1984) bzw. in Klammern nach den eigenen Ergebnissen angegeben.



Die zwei kleineren Proteine von 55 kDa und 50 kDa, die in den benachbarten Fragmenten EcoRI I und Eco RI E kodieren, reagierten mit SB bzw. mit DI. Mit DE und DK ergaben sich Kreuzreaktionen mit dem 55-kDa-Protein. Ein bisher nicht identifiziertes Produkt von 120 kDa konnte mit dem Fragment EcoRI D (monoklonaler Antikörper SC) korreliert werden. Ein Protein, was von DH oder DG präzipitiert wird, konnte in der Translation von hybrid-selektierten mRNAs nicht zugeordnet werden.

4. Homologien zwischen EBV und Herpesvirus saimiri:

Unter den humanpathogenen Herpesviren steht EBV dem Herpesvirus saimiri verwandtschaftlich am nächsten. Da zum Beginn dieser Arbeit zwar die gesamte DNA-Sequenz von EBV (BAER et al. 1984) publiziert war, von Herpesvirus saimiri dagegen bis jetzt nur wenige Teile der Genomsequenz bekannt sind, wurde versucht, über immunologische Kreuzreaktionen Homologien auf Proteinebene zwischen den beiden lymphotropen Viren herauszufinden. Als erstes wurden in vitro Translationen von HVS-spezifischen RNAs mit einem EBV-positiven Pool-Serum von NPC-Patienten inkubiert (Abb. 18a). Dabei zeigten in erster Linie die Proteine von 146 kDa, 115 kDa und 55 kDa eine deutliche Kreuzreaktion mit dem EBV-spezifischen Serum. Weitere präzipitierte Banden (bei ca 80 kDa und bei ca 30 kDa) konnten nicht eindeutig mit den bis dahin identifizierten HVS-Proteinen korreliert werden. Zusätzlich zu dem Patientenserum wurden verschiedene Antiseren getestet, die gegen rekombinante EBV-Proteine bzw. Teilprodukte davon oder synthetische Peptide produziert worden waren. Das erste davon war gegen ein rekombinantes Fusionsprodukt aus Teilen des DNA-bindenden p138 und des großen Membranproteins (gp 350/250) von EBV produziert worden (MOTZ 1986). Das Serum gegen p138 reagierte in starkem Maße mit dem 115-kDa-Protein von Herpesvirus saimiri und mit einigen kleineren Polypeptiden, die als Ergebnis unvollständiger Translation anzusehen sind (Abb. 18b). Bei einer Untersuchung von hybrid-selektierten mRNAs (Abb. 18b rechter Teil) wurde es als das im Fragment KpnI F und den angrenzenden Genombereichen kodierende DNA-bindende Protein charakterisiert. Dies bedeutet, daß beide DNA-bindenden Proteine homolog sind und damit in weiten Teilen konserviert. Eine Kreuzreaktion in bezug auf das EBV-Membranprotein konnte dagegen unter den Translationsprodukten von Herpesvirus saimiri nicht gefunden werden, auch nicht bei der Translation von hybrid-selektierten RNAs. Ebenso war die Reaktion von anderen getesteten Seren

gegen EBV-Proteine (sowie Peptid-Antisera) negativ, bzw. brachten keine eindeutig korrelierbaren Resultate.

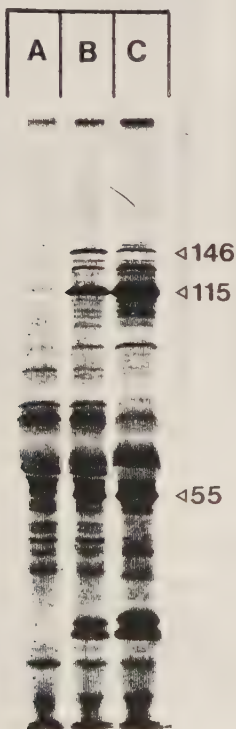


Abb. 18a: Immunpräzipitation mit NPC-Pool-Serum

RNA aus uninfizierten OMK-Zellen (A) sowie frühe (B) und späte (C) RNA aus infizierten OMK-Zellen wurden *in vitro* translatiert, und die Ansätze wurden hinterher mit einem Poolserum von NPC-Patienten inkubiert, um eine Kreuzreaktion mit HVS-spezifischen Polypeptiden zu testen.

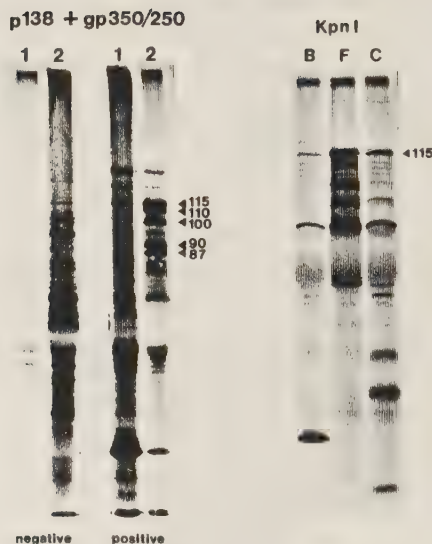


Abb. 18b: Immunpräzipitation mit Antiseren gegen rekombinante EBV-Proteine

Links: Translation von RNA aus uninfzierten Zellen (1) und HVS-infzierten Zellen (2) und anschließender Immunpräzipitation mit einem Kaninchenserum, das gegen ein rekombinantes Fusionsprotein mit Anteilen des EBV p138 und des gp350/250 erzeugt worden war ("positiv"). Daneben ist die Reaktion mit dem entsprechenden Präimmunserum gezeigt ("negativ").

Rechts: In vitro Translation von hybrid-selektierten mRNAs (Hybridisierung mit KpnI B, KpnI F bzw. KpnI C) und Inkubation der Ansätze mit dem gleichen Antiserum.

Ein umgekehrtes Experiment, die Kreuzreaktion von HVS-spezifischen Antiseren mit EBV-Translationsprodukten, ist in Abb. 19 gezeigt. RNAs aus EBV-negativen BJAB-Zellen, aus induzierten Raji-Zellen, die frühe Genprodukte exprimieren, sowie aus induzierten P3HR1-Zellen, die das gesamte Spektrum an EBV-Proteinen im lytischen Zyklus synthetisieren, wurden in vitro translatiert (die EBV-RNA-Proben waren von R. Seibl aus der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt worden) und anschließend inkubiert mit den antil1-o- (a) und dem R1-Antiserum (b) sowie zum Vergleich mit NPC-Poolserum (c). Deutlich zu sehen waren zwei kreuzreagierende Proteine, nämlich das frühe p47 in Raji- und P3HR1-Zellen und

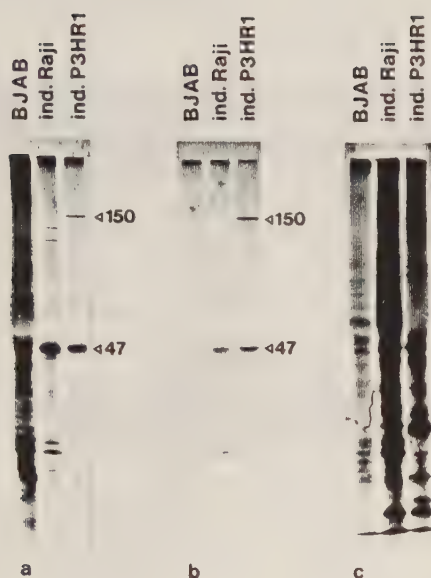


Abb. 19: Kreuzreaktion von EBV-Polypeptiden mit HVS-spezifischen Antiseren

RNA aus einer EBV-negativen Burkitt-Lymphom-Zelllinie (BJAB), RNA aus der EBV-transformierten Raji-Zelllinie (synthetisiert nur frühe Genprodukte), induziert mit Phorbol ester, sowie RNA aus der EBV-transformierten P3HR1-Zelllinie (synthetisiert frühe und späte Genprodukte), ebenfalls nach Induktion, wurden *in vitro* translatiert und mit drei verschiedenen Antiseren inkubiert: (a) anti11-o-Serum, (b) R1-Serum, beide gegen HVS-spezifische Proteine gerichtet, sowie zum Vergleich (c) ein NPC-Poolserum.

das späte Strukturprotein p150 ausschließlich in den P3HR1-Zellen. Das p138 als Äquivalent zu dem 115-kDa-Protein von Herpesvirus saimiri wurde von diesen Antiseren dagegen nicht erkannt. Insgesamt gesehen stellt dies nur einen Anfang dar, was die Kreuzreaktionen bei homologen Proteinen zwischen beiden Herpesviren anbelangt. Nach den vor kurzem publizierten ersten Sequenzvergleichen (GOMPELS et al. 1988) sind bei Entwicklung von weiteren etwa monospezifischen Antiseren z.B. gegen rekombinante Produkte zusätzliche Kreuzreaktionen zu erwarten.

5. Die immediate early Genprodukte:

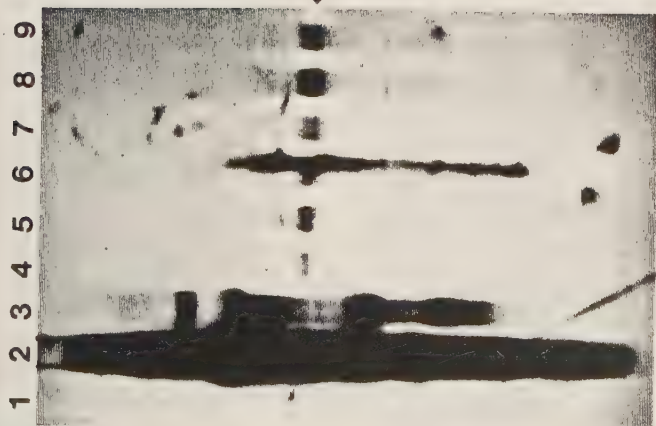
Ein Hauptpunkt der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung der allerersten Genprodukte innerhalb des lytischen Replikationszyklus. Diesen sogenannten immediate early Produkten oder wenigstens einigen von ihnen kommt eine Schlüsselrolle zu, was die Regulation der viralen Genexpression insgesamt angeht. Durch Inhibition der Proteinsynthese in den infizierten Zellen sollten die entsprechenden immediate early Transkripte angereichert werden. Es zeigte sich jedoch, daß im Gegensatz zu anderen Herpesviren (HSV, CMV u. a.) bei Herpesvirus salmuri keine hohe Ausbeute an immediate early mRNAs erzielt werden konnte, entweder wegen der Instabilität dieser Transkripte in den Zellen oder wegen einer nur sehr geringen Synthese. Deshalb mußten jeweils große RNA-Mengen im Vergleich zu den frühen und späten RNA-Proben eingesetzt werden, um diese Produkte entdecken zu können.

Zunächst wurden die Transkripte zu den immediate early Genen über eine Hybridisierung von Northern Blots analysiert. Abb. 20 a - d zeigt Northern Blots mit später und früher RNA sowie mit 6 verschiedenen RNAs aus Cycloheximid-behandelten infizierten OMK-Zellen (8 Std - Spalte 4, 5, 6 - bzw. 12 Std - Spalte 7, 8, 9 - nach Infektion extrahiert), die mit den Fragmenten EcoRI D, KpnI E, HindIII G und EcoRI F hybridisiert worden waren. Die eingesetzte Menge an immediate early RNA war hier 3 - 4 mal so hoch wie bei den anderen Proben. EcoRI D erbrachte eine Hybridisierung mit einer RNA von 3.5 kb Länge in allen 6 immediate early RNA-Proben. Dieses Transkript fand sich nicht mehr in der frühen RNA. Bei den anderen 3 Fragmenten waren ebenfalls virusinduzierte Transkripte unter Cycloheximid-Bedingungen zu sehen, aber schwächer als das erstgenannte und nicht so gleichmäßig in den diversen immediate early RNA-Präparationen. KpnI E reagierte mit einem 3.8-kb-Transkript, mit den beiden überlappenden Fragmenten EcoRI F und HindIII G konnte eine 1.8-kb-RNA als

Abb. 20 (auf den nächsten beiden Seiten): Immediate early Transcription

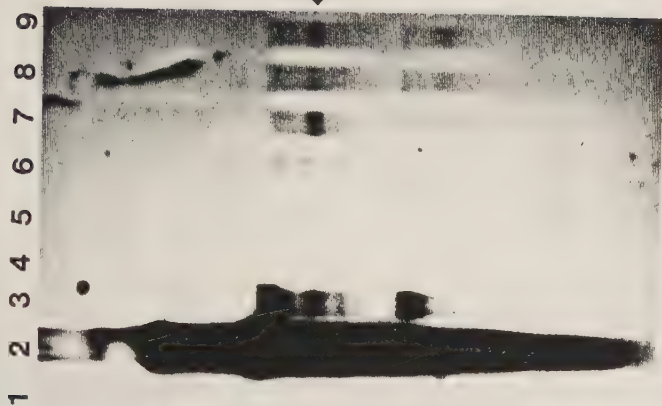
GesamtRNAs aus uninfizierten OMK-Zellen (1), aus infizierten OMK-Zellen 20 Std nach Infektion (2), aus infizierten, mit PAA behandelten OMK-Zellen (3) sowie aus infizierten und mit Cycloheximid behandelten OMK-Zellen (4 - 9; 4, 5 und 6: 8 Std nach Infektion, 7, 8 und 9: 12 Std nach Infektion) wurden auf denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen gebロットet und mit klonierten ³²P-markierten HVS-Genomfragmenten hybridisiert. HVS-spezifische immediate early Transkripte sind mit Pfeil Größe in kb gekennzeichnet (links sind die Marker-RNAs eingetragen: 23S- und 16S-rRNA von *E. coli* sowie die internen 28S- und 18S-rRNAs).

EcoRI D



3.5 kb

KpnI E

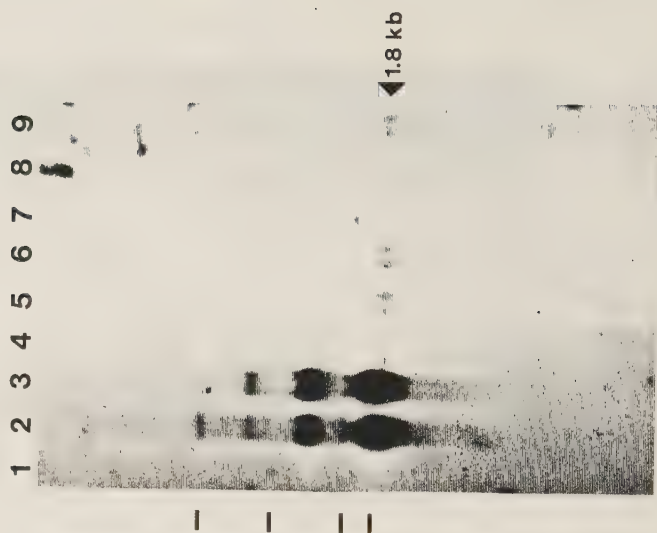


3.8 kb

Eco RI F



Hind III G



Immediate early identifiziert werden. Die beiden letzteren Transkripte wurden im Gegensatz zu dem ersten in den späteren Infektionsphasen verstärkt synthetisiert. Hybridisierungen der gleichen Northern Blots mit allen anderen Teilstücken des Virusgenoms waren negativ, was die ganz frühen Transkripte betraf (nicht gezeigt).

Nachdem die genannten drei Transkripte gefunden worden waren, wurde wiederum durch in vitro Transkripte von hybrid-selektierten mRNAs (aus Cycloheximid-behandelten Zellen) untersucht, welche viralen Proteine zu diesen mRNAs gehören. Dabei wurde gegenüber den vorherigen Hybrid-Selektionen das 5-6fache an RNA eingesetzt, weil die immediate early Transkripte nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind. Außerdem mußten die Proteingele länger exponiert werden, was zu einem erhöhten Background führte. Abb. 21 zeigt das Ergebnis dieser Translation, die zunächst ohne Immunpräzipitation durchgeführt wurde. Zwei virale Proteine von 140 kDa und 94 kDa waren zu erkennen, deren mRNAs mit den Fragmenten EcoRI D bzw. KpnI E / EcoRI C selektiert worden waren. Dies bedeutete, daß die immediate early 3.5-kb-RNA in EcoRI D für das 140-kDa-Produkt kodiert, während die überlappende Region der Fragmente KpnI E und EcoRI C das Gen für die 3.8-kb-RNA und das damit korrelierte 94-kDa-Protein enthält. Ein zu der RNA von 1.8 kb in EcoRI F / HindIII G passendes Polypeptid konnte hierbei nicht entdeckt werden. Da ein relativ kleines Protein erwartet wurde, wurde es vermutlich vom Background verdeckt. Deshalb wurde in einem weiteren Experiment mit einer Immunpräzipitation (anti-I₁-o-Serum) versucht, dieses immediate early Produkt zu finden. In Abb. 22 ist zu sehen, daß bei Immunpräzipitation ein Protein von 30 kDa in den Fragmenten EcoRI F und HindIII G sichtbar wurde. In anderen Fragmenten, die hierbei verglichen wurden, war kein spezifisches immediate early Produkt zu erkennen, wie auch von den Northern Blots her zu erwarten war. Die Proteine von 140 kDa und 94 kDa waren nicht präzipitierbar aus einer Translation von hybrid-selektierten immediate early RNAs heraus. Bei später RNA dagegen ist eine Präzipitation des 94-kDa-Proteins in geringem Maße möglich (siehe Abb. 13), das 140-kDa-Protein wurde dabei aber nicht gefunden. Auch ein Versuch einer Immunpräzipitation des 140-kDa-Proteins mit dem monoklonalen Antikörper SC, der unter den späten Proteinen das von 120 kDa in EcoRI D erkennt (siehe 3.4.), war negativ. Das Protein von 140 kDa ist also mit dem von 120 kDa nicht homolog.

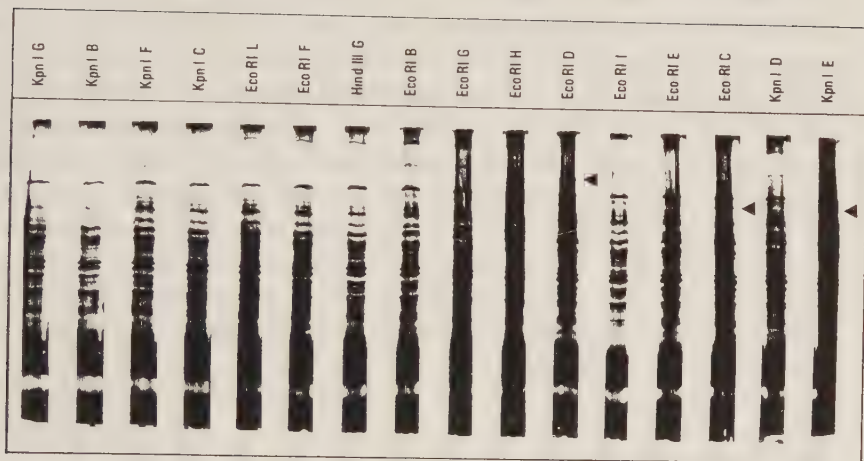
Um den zeitlichen Verlauf der Genexpression in der Frühphase der Virusinfektion unabhängig von einer Cycloheximid-Hemmung zu dokumentieren, wurden zwei Translationen von hybrid-selektierten RNAs aus infizierten Zellen

Abb. 21 (nächste Seite oben): *In vitro* Translation von hybrid-selektierten immediate early RNAs

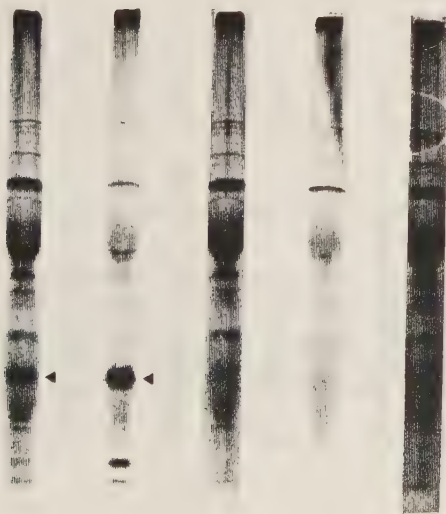
GesamtRNA aus infizierten, Cycloheximid-behandelten OMK-Zellen wurde gegen filtergebundene HVS-Genomfragmente hybridisiert, die selektierten mRNAs wurden *in vitro* translatiert. Die Translationsprodukte wurden auf 15%-SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. HVS-spezifische Polypeptide sind in der Abbildung mit schwarzem Pfeil gekennzeichnet.

Abb. 22 (nächste Seite unten): *In vitro* Translation von hybrid-selektierten immediate early RNAs und Immunpräzipitation mit anti-11-o-Serum

Mit den Fragmenten HindIII G, EcoRI F, EcoRI I, EcoRI E und KpnI D hybrid-selektierte immediate early mRNAs wurden translatiert, die Translationsprodukte mit dem gegen HVS-induzierte Proteine gerichteten anti-11-o-Serum immunpräzipitiert und auf SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das im EcoRI-F- und HindIII-G-Fragment kodierende 30-kDa-Polypeptid ist mit Pfeil gekennzeichnet.



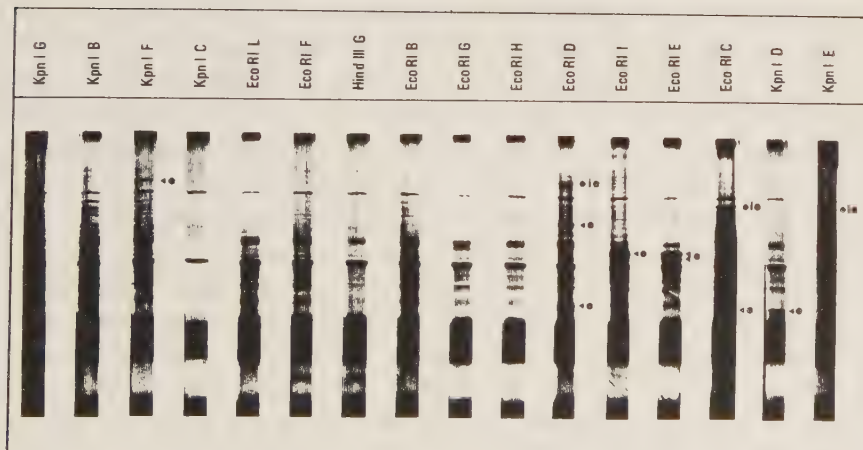
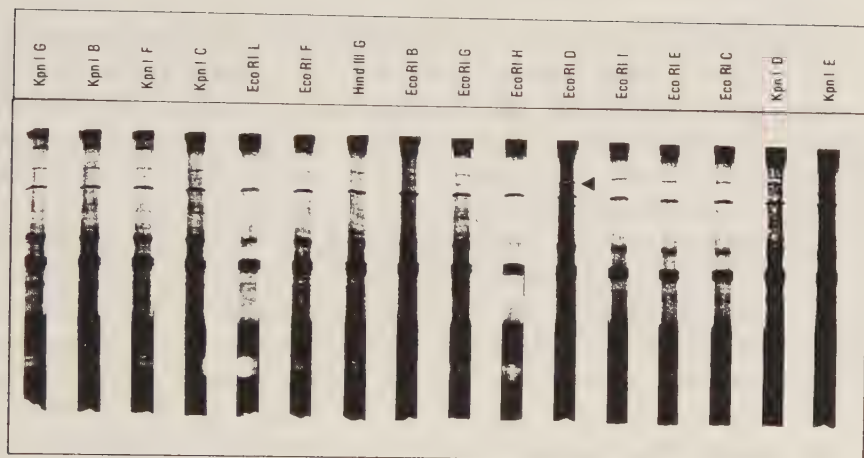
Hind G Eco F Eco I Eco E Kpn D



4 Std und 8 Std nach Infektionsbeginn durchgeführt (Abb. 23 a + b). Dabei war zu sehen, daß das 140-kDa-Produkt bzw. seine RNA als allererstes virales Genprodukt in den infizierten Zellen entsteht, die beiden anderen immediate early Gene beginnen erst später mit der Transkription. Nach 8 Std dagegen war von dem 140 kDa praktisch nichts mehr zu sehen, 94 kDa und 30 kDa wurden da bereits stark exprimiert, aber auch einige andere, frühe Genprodukte wurden zu diesem Zeitpunkt schon synthetisiert (vgl. dazu 10 Std Infektion in 2.1., Abb. 11). Damit ist klar, daß 140 kDa als erstes produziert wird, aber seine Expression wird schon bald wieder abgeschaltet, wenn das frühe Stadium der Infektion erreicht ist. Die anderen beiden immediate early Gene werden unter Cycloheximid-Hemmung bereits transkribiert, jedoch erreicht ihre Expression erst in späteren Phasen ihr Maximum.

Abb. 23 a + b (nächste Seite): HVS-spezifische Genprodukte 4 bzw. 8 Std nach Infektion

Mit *in vitro* Translation hybrid-selektierter mRNAs wurden die Genprodukte nachgewiesen, die bereits 4 Std bzw. 8 Std nach der Infektion mit HVS in den Zellen synthetisiert worden sind. Hybrid-Selektion, Translation und Auftrennung auf SDS-Polyacrylamidgelen erfolgten wie bei Abb. 21. Nach 4 Std ist nur das 140-kDa-Polypeptid in EcoRI D zu sehen (schwarzer Pfeil), nach 8 Std liegen mehrere HVS-spezifische Polypeptide vor (ie = immediate early, e = early).



6. Frühe und späte Transkripte von Herpesvirus saimiri:

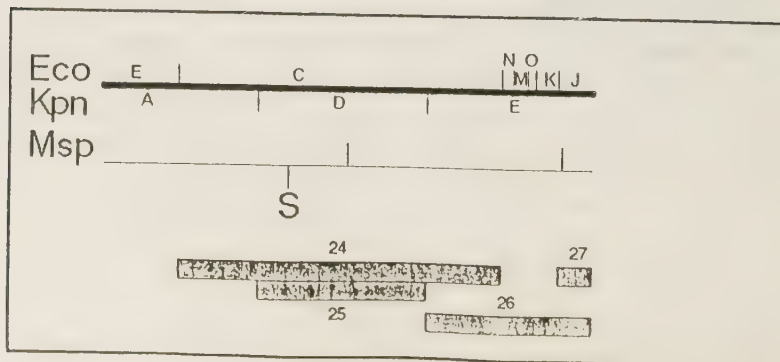
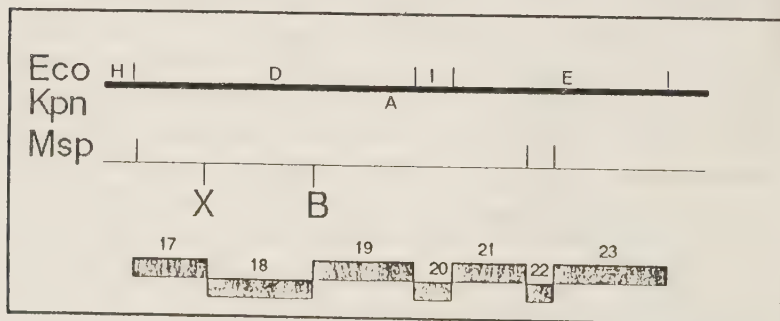
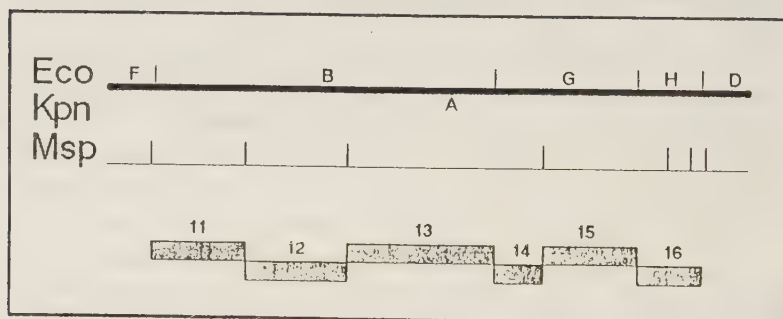
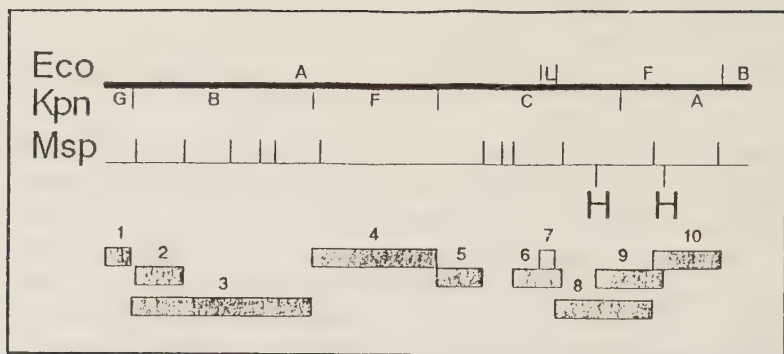
Die Analyse der Genexpression von Herpesvirus saimiri auf RNA-Ebene durch in vitro Translation sollte ergänzt werden durch eine direkte Untersuchung und Kartierung der mRNAs über eine Hybridisierung von Northern Blots mit allen Fragmenten des Virusgenoms. Für die Immediate early Genregionen ist dies bereits in 5. gezeigt worden. In den Abb. 25 und 26 sind alle Abschnitte des Genoms erfaßt mit den entsprechenden Ergebnissen der Hybridisierung von späten und frühen RNAs. Die einzelnen Fragmente, die in diesen Hybridisierungen verwendet wurden, sind in Abb. 24 aufgeführt. Sie lagen als Plasmidklone vor (siehe 3.1.) oder wurden als Teilstücke in pUC18 subkloniert. Nach Restriktionsverdau wurden die Fragmente auf Agarosegelen aufgetrennt, aus diesen durch Elektroelution eluiert und für die Hybridisierung durch eine "nick translation" mit ^{32}P markiert. RNAs aus uninfizierten OMK-Zellen und aus mit Herpesvirus saimiri 11 infizierten Zellen (späte, frühe und immediate early RNAs) wurden auf Formaldehyd-Agarose-Gelen aufgetrennt, auf Nylon-Membranen (Hybond-N, Amersham) gebロットet und durch UV-Bestrahlung fixiert.

Bei den Untersuchungen des linken Genomrands (Fragmente KpnI G und KpnI B - MspI 1) wurden zusätzlich zu der späten RNA aus den Wildtyp-infizierten Zellen auch RNAs aus Zellen aufgetrennt, die mit den Stämmen 11att, S4 und KH3 infiziert worden waren. Bei 11att fehlen ca 2200 bp am linken Rand der M-DNA, bei KH3 ist eine Deletion von 600 bp in KpnI B, bei S4 eine Deletion von 4000 bp in KpnI G und KpnI B vorhanden, 11att und S4 sind nicht mehr oncogen im Gegensatz zu KH3 und dem Wildtyp Stamm 11. Im KpnI-G-Fragment waren bei Stamm 11 (Spur 4) zwei mRNAs von 5.1 kb und 2.8 kb zu erkennen, die in das benachbarte Stück KpnI B - MspI 1 hineinreichen. Bei der KH3-Mutante (Spur 2) war das größere Transkript mit 4.6 kb um etwa den Betrag kürzer, den die Deletion ausmacht, dazu kommt ein weiteres Transkript von 1.9 kb. Bei S4 war mit KpnI G nur ein 0.9-kb-Bruchstück zu sehen, was ebenfalls eine Verkürzung des großen Transkripts um etwa den Bereich der Deletion entsprach, bei dem Fragment KpnI B - MspI 1 gab es keine Hybridisierung. 11att-RNA hybridisiert nicht mit KpnI G, mit KpnI B - MspI 1 wurde eine 1.8-kb-RNA gefunden, die auch in 11 und KH3 vorhanden ist. Von der größeren RNA wurde bei 11att nichts gefunden.

Abb. 24 (nächste Seite): Genomfragmente, die bei der Analyse der HVS-spezifischen Transkripte zur Hybridisierung der Northern Blots verwendet wurden

Die L-DNA des Genoms von Herpesvirus saimiri Stamm 11 ist, in 4 Abschnitte unterteilt, mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen dargestellt. Die grauen Rechtecke unter dem Genom geben die plasmidklonierten Fragmente an, mit denen die Northern Blots auf den Abbildungen 25 und 26 hybridisiert wurden. Numerierung der einzelnen Genomfragmente:

- 1 = KpnI G
- 2 = KpnI B - MspI 1
- 3 = KpnI B
- 4 = KpnI F
- 5 = KpnI C - MspI 3
- 6 = KpnI C - MspI 2
- 7 = EcoRI L
- 8 = EcoRI F - MspI 1
- 9 = HindIII G
- 10 = EcoRI F - MspI 2
- 11 = EcoRI B - MspI 3
- 12 = EcoRI B - MspI 2
- 13 = EcoRI B - MspI 1
- 14 = EcoRI G - MspI 2
- 15 = EcoRI G - MspI 1
- 16 = EcoRI H
- 17 = EcoRI D - XhoI 2
- 18 = EcoRI D - BamHI/XhoI 1
- 19 = EcoRI D - BamHI 2
- 20 = EcoRI I
- 21 = EcoRI E - MspI 2
- 22 = EcoRI E - MspI 3
- 23 = EcoRI E - MspI 1
- 24 = EcoRI C
- 25 = KpnI D
- 26 = KpnI E
- 27 = EcoRI J



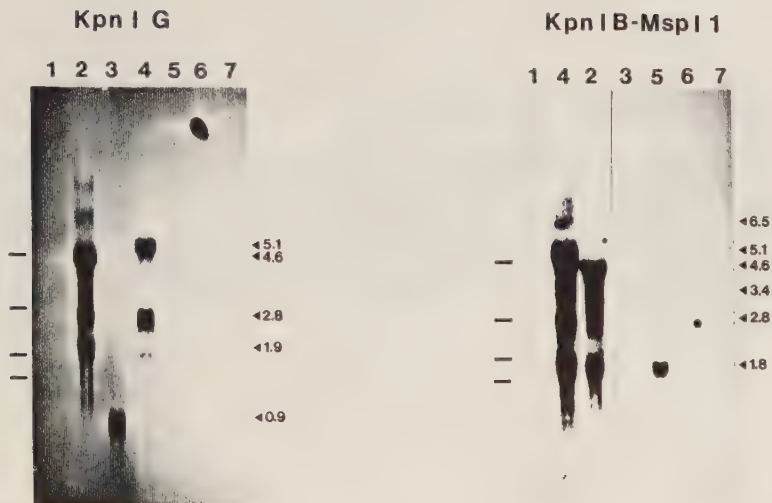
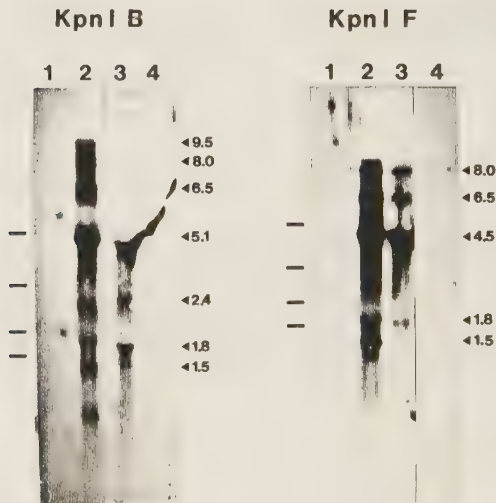


Abb. 25: Transkription am linken Ende des Genoms bei verschiedenen HVS-Stämmen

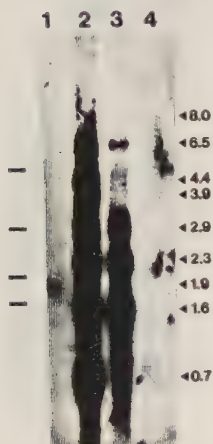
Northern Blots mit RNAs aus uninfizierten OMK-Zellen (1), aus OMK-Zellen infiziert mit den HVS-Stämmen KH3 (2), S4 (3), 11 (4) und 11att (5), sowie RNA aus HVS-11-infizierten Zellen, die mit PAA (5) bzw. mit Cycloheximid behandelt worden waren, wurden gegen die beiden Fragmente am linken Genomrand (KpnI G und KpnI B - Msp I) hybridisiert, da innerhalb dieser beiden Bereiche Deletionen in den Stämmen KH3, S4 und 11att vorliegen.

Abb. 26 (auf den nächsten Seiten): Hybridisierung von Northern Blots mit den restlichen Fragmenten des HVS-Genoms

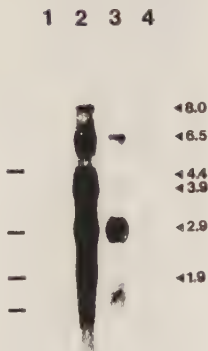
Northern Blots mit RNAs aus uninfizierten OMK-Zellen (1), HVS-11-infizierten OMK-Zellen 20 Std nach Infektion, infizierten und PAA-behandelten Zellen sowie infizierten und Cycloheximid-behandelten Zellen wurden mit den in Abb. 24 aufgeführten Fragmenten des HVS-Genoms hybridisiert, um die viralen Transkripte insgesamt zu erfassen und mit dem Genom zu korrelieren. Virus-spezifische Transkripte sind mit Pfeil und Länge in kb markiert, die RNA-Marker (*E. coli* 23S- und 16S-rRNA, interne 28S- und 18S-rRNA) sind jeweils links neben dem Blot angedeutet.



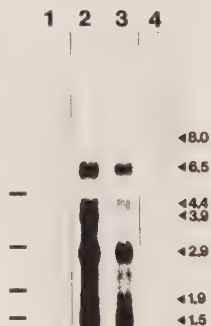
Kpn I C - Msp I 3



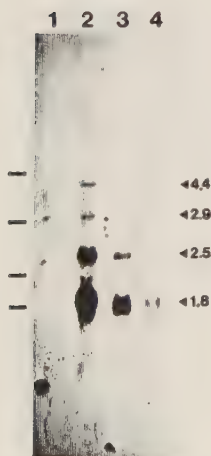
Kpn I C - Msp I 2



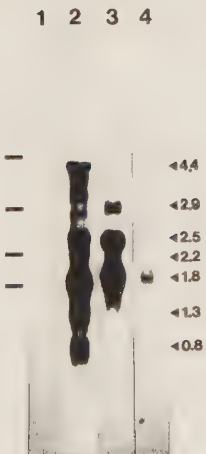
Eco RI L



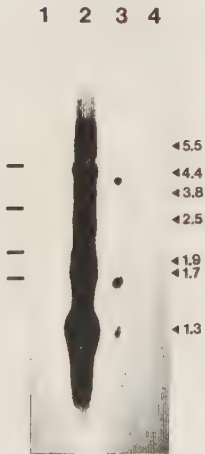
Hind III G



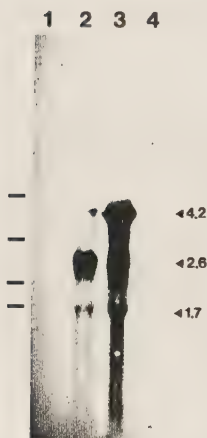
Eco RI F - Msp I 1



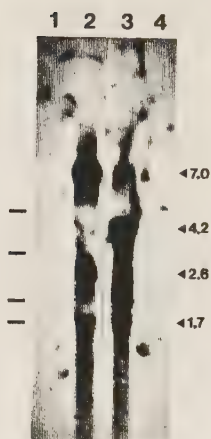
Eco RI F - Msp I 2



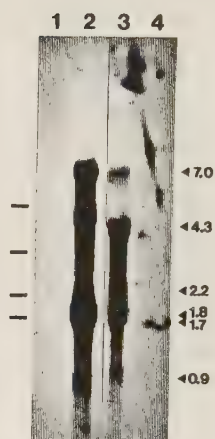
Eco RI B-Msp I 3



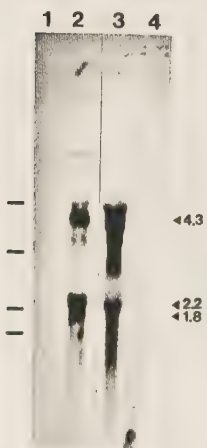
Eco RI B-Msp I 2



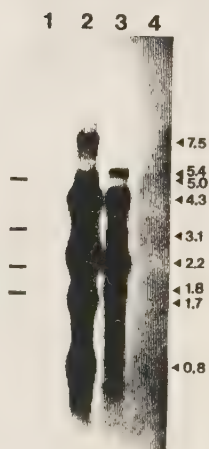
Eco RI B-Msp I 1



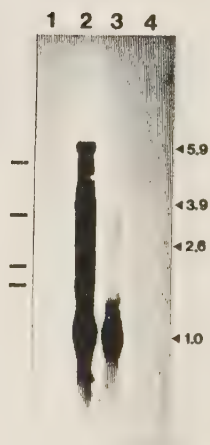
Eco RI G-Msp I 2



Eco RI G-Msp I 1

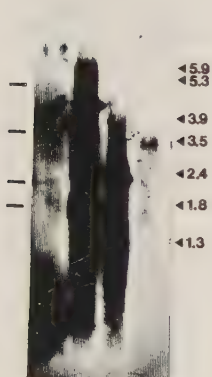


Eco RI H



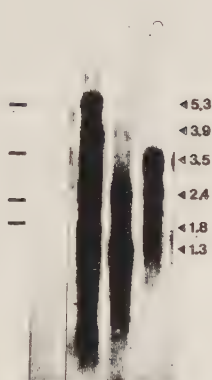
Eco RI D-Xho I 2

1 2 3 4



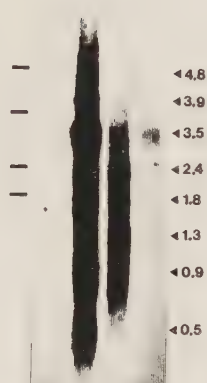
Eco RI D-B/X. 1

1 2 3 4



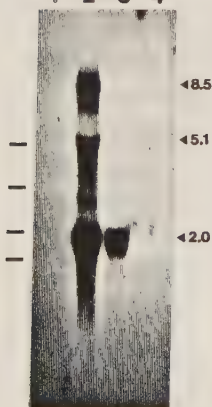
Eco RI D-Bam HI 2

1 2 3 4



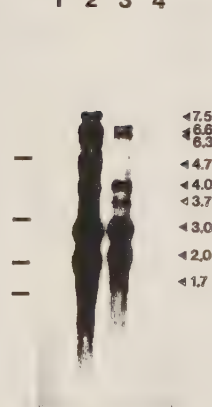
Eco RI I

1 2 3 4



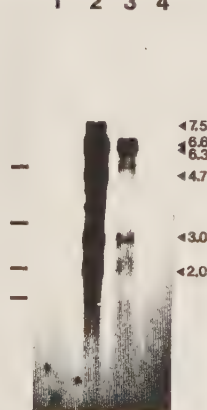
Eco RI E-Msp I 2

1 2 3 4

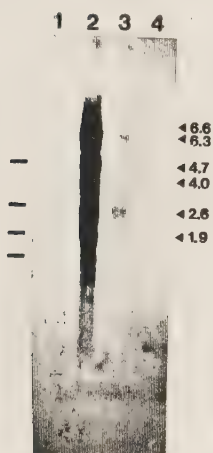


Eco RI E-Msp I 3

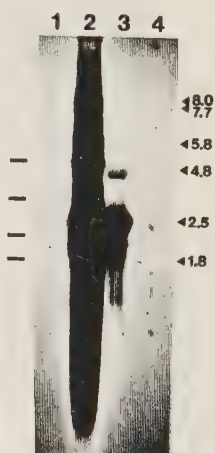
1 2 3 4



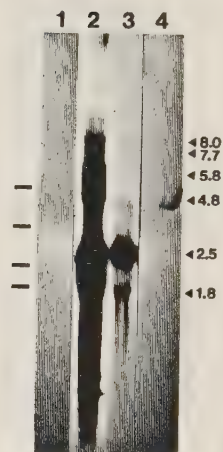
EcoRI E-MspI 1



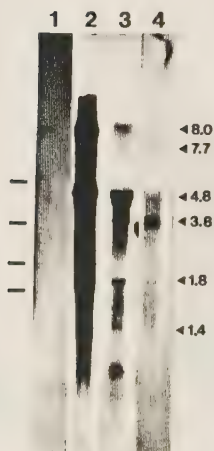
EcoRI C



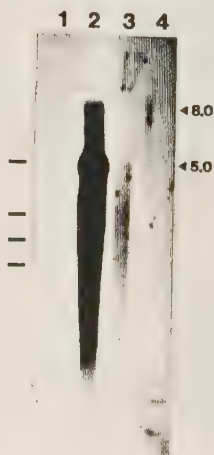
KpnI D



KpnI E



EcoRI J



1. Allgemeines zur Untersuchung der Genexpression bei Herpesviren:

Die Untersuchung der Genexpression eines Herpesvirus umfaßt die Charakterisierung von etwa 50 - 100 virusinduzierten Genprodukten und deren Kartierung auf einem Genom von wenigstens 100 bis zu über 200 kbp Länge sowie eine zeitliche wie funktionelle Elnordnung dieser Produkte in ein kaskadenartiges, sich selbst regulierendes System. Finden sich schon bei kleineren Viren (z.B. Picornaviren, Retroviren) mit wenigen selbstkodierten Proteinen relativ komplexe Mechanismen zur Regulation ihrer Genexpression im Zusammenspiel mit den Gegebenheiten in den jeweiligen Wirtszellen, so gilt dies umso mehr für die Herpesviren, deren Vertreter neben den Pockenviren zu den größten Virusarten gehören. Während kleine Viren viele zelluläre Funktionen für ihre Replikation in Anspruch nehmen und außer den strukturellen Komponenten nur für wichtige Schlüsselenzyme wie etwa Protease, Reverse Transkriptase, Integrase und Ribonuclease H bei Retroviren oder auch nur für verschiedene Proteasen bei Picornaviren kodieren, haben die Herpesviren eine wesentlich komplexere Ausstattung an Genen und Genprodukten. Kennzeichnend sind vor allem Gene für Enzyme, die die DNA-Replikation betreffen, beginnend mit einer eigenen DNA-Polymerase, die bis jetzt bei allen untersuchten Herpesviren nachgewiesen wurde. Dazu kommen Ribonucleotid-Reductase, Thymidinkinase, Thymidylat-Synthase und andere Enzyme sowie weitere DNA-bindende Proteine, deren Funktion im einzelnen bislang noch nicht geklärt ist. Diese Vielzahl von viruseigenen Genen und Genprodukten setzt natürlich eine abgestimmte Regulation der Genexpression voraus, um die Virusreplikation effizient und ökonomisch in den infizierten Zellen ablaufen zu lassen. Hauptcharakteristikum herpesviraler Replikation ist eine stufenartig angelegte zeitliche Abfolge der Synthese von verschiedenen Gruppen von Genprodukten, bei denen stets die Transkription von Genen einer Gruppe durch virale Faktoren in der vorangehenden Gruppe angeschaltet bzw. stimuliert wird. Ist die nächste Stufe der Genexpression erreicht, so werden die früheren Gene in den meisten Fällen abgeschaltet. Die Mechanismen der An- und Abschaltung, Stimulation und Repression erfolgen primär auf der Ebene der Transkription, d.h. durch Transaktivierung von Genen über Promotoren und Enhancer entweder direkt durch Anbinden an die DNA oder indirekt über eine Einbeziehung zellulärer Transkriptionsfaktoren, aber es gibt auch Hinweise für

posttranskriptionelle Regulation (GEBALLE et al. 1986; GOINS und STINSKI 1986; SPECK und STROMINGER 1985; SAMPLE et al. 1986; SCHWARZMANN 1988).

Zur Analyse eines solchen Systems herpesviraler Genexpression bieten sich mehrere Ansatzpunkte. Die Sequenzierung des gesamten Genoms stellt in jedem Fall eine Basis dar, um die Gene und Genprodukte zu untersuchen. Bei Herpesviren war dies lange Zeit zu schwierig, weil es eines hohen Zeit- und Personalaufwands bedurfte, um die weit über 100 kbp eines Herpesvirusgenoms zu sequenzieren. Durch die rasche Verbesserung der Sequenzlertechniken in den letzten Jahren hat sich dies geändert, von den humanpathogenen Herpesviren sind mittlerweile die vollständigen DNA-Sequenzen des EBV (BAER et al. 1984), des VZV (DAVISON und SCOTT 1986) und des HSV 1 (McGEOCH et al. 1985; McGEOCH et al. 1988) publiziert. Computeranalysen dieser Sequenzen (Suche nach Leserahmen, Promotoren u.a.) bieten mehrere Möglichkeiten, die diversen Gene, ihre Promotoren, Enhancerstrukturen usw. zu analysieren, etwa auch durch Herstellung von (mono)spezifischen Antisera gegen rekombinante Proteine oder gegen synthetische Peptide. Damit können z.B. die Kinetik der Synthese sowie die intrazelluläre Lokalisation von viralen Proteinen untersucht werden. Potentielle Regulationssequenzen können durch Klonierung an geeignete Indikatorgene und Testung dieser Konstrukte in relevanten Zellsystemen analysiert werden.

Andere Ansätze unabhängig von einer vorliegenden DNA-Sequenz sind die Charakterisierung der virusinduzierten Proteine in vivo, meist unter Zuhilfenahme von Antisera, sowie die Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene, direkt über Hybridisierung von Northern Blots bzw. durch in vitro Transkription mit Kernextrakten ("run on transcription"), oder indirekt über eine in vitro Translation. Letzteres bietet dann auch die Möglichkeit der Korrelation von in vivo Ergebnissen und Virusgenom mittels in vitro Translation von hybridselektierten mRNAs und damit der Kartierung des Genoms. Liegt die DNA-Sequenz vor, so kann man eine feinere Kartierung auf der Grundlage der einzelnen Leserahmen erreichen. Weitere Methoden zur Charakterisierung der Genprodukte bieten sich in einer cDNA-Klonierung mit anschließender Sequenzierung oder Expression mit geeigneten Vektoren auch in eukaryotischen Systemen. Dazu wurden inzwischen verschiedene Methoden der Funktionsanalyse etabliert, hier vor allem bei der Identifikation von Enzymen (z.B. Thymidylat-Synthase) oder bei der Analyse von Transaktivatoren (über "CAT-assay" u. ä.).

Bei Herpesvirus saimiri wurde zunächst mit der Untersuchung in vivo begonnen, d.h. die virusspezifischen Proteine wurden durch in vivo Markierung charakterisiert, inklusive zeitlicher Abfolge, posttranslationaler Modifikationen und zum Teil auch funktioneller Eigenschaften (MODROW 1983; MODROW und WOLF

1983; O'HARE et al. 1983; KEIL et al. 1984). In der eigenen Arbeit sollten diese Ergebnisse ergänzt werden durch eine Untersuchung der Genexpression auf RNA-Ebene, wobei die erwähnte Korrelation zum Virusgenom erreicht werden sollte. Dazu wurden in erster Linie Hybrid-Selektion der verschiedenen mRNAs mit anschließenden in vitro Translationen, Northern-Blot-Hybridisierung und Charakterisierung der Virusproteine mit Hilfe von Antisera und monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Mit diesen Methoden gelang eine weitgehende Kartierung des HVS-Genoms zusammen mit einer Charakterisierung der meisten viralen Genprodukte. Die im Ergebnisteil aufgeführten Daten sollen im folgenden im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus anderen Arbeitsgruppen diskutiert werden.

2. Die Immediate early Genprodukte:

Betrachtet man den kaskadenartigen Ablauf der Genexpression bei Herpesviren, so wird klar, daß am Startpunkt der Virusreplikation die wichtigsten regulatorischen Ereignisse für den gesamten Infektionszyklus ablaufen müssen. Hier werden zunächst die sogenannten Immediate early Gene transkribiert, ohne daß in den Zellen bis dahin andere virale Proteine neu synthetisiert worden sind. Es kann lediglich sein, daß ein vom Virion eingebrachter Faktor, wie er zuerst bei HSV 1 gefunden wurde (BATTERSON und ROIZMAN 1983), die Transkription dieser Gene stimuliert. Unter diesen Immediate early Proteinen muß sich dann wenigstens ein viraler Faktor befinden, der die Expression von frühen und eventuell auch von späten Genen in trans aktiviert. Eine Anreicherung der Immediate early Transkripte in den infizierten Zellen ist normalerweise möglich, indem man die zelluläre Proteinsynthese vom Zeitpunkt der Virusinfektion an hemmt. Bei Herpesvirus salmuri war diese Methode nur begrenzt erfolgreich, insofern als nur eine geringe Menge an Immediate early mRNAs aus den Zellen gewonnen werden konnte. Dies liegt möglicherweise an einer hohen Abbaurate für diese mRNAs in den Zellen oder an einer sehr geringen Synthese, es könnte vielleicht auch bedingt sein durch die mangelhafte Synchronisation des Infektionsbeginns in den einzelnen Zellen eines Monolayers (RANDALL et al. 1985). Denkbar ist hingegen auch ein spezieller Regulationsmechanismus (s. u.) an dieser Stelle, bei dem eine gesteigerte Produktion der Immediate early Produkte nicht notwendig ist.

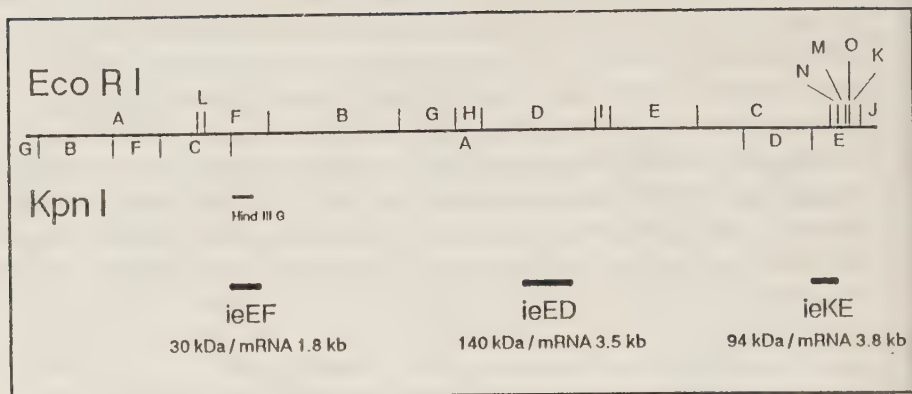


Abb. 27: Kartierung der immediate early Genprodukte von *Herpesvirus saimiri*

Die kodierenden Regionen der drei identifizierten immediate early Genprodukte sind im Schema der L-DNA von *Herpesvirus saimiri* durch die dicken schwarzen Linien angedeutet, dazu sind die Größen der Polypeptide und der korrespondierenden Transkripte angegeben.

Abb. 27 gibt eine schematische Darstellung der Ergebnisse dieser Suche nach den immediate early Genprodukten, von denen drei identifiziert werden konnten, die nach ihren kodierenden Regionen mit ieED (für EcoRI D), ieKE (für KpnI E) und ieEF (für EcoRI F) bezeichnet wurden. Über Hybridisierung von Northern Blots wurden zunächst drei Transkripte von 3.8, 3.5 und 1.8 kb gefunden, die unterschiedlich stark in den Cycloheximid-behandelten Zellen produziert werden. Bei 6 getesteten RNA-Proben (8 bzw. 12 Std nach Infektionsbeginn extrahiert) war nur die 3.5-kb-RNA gleichmäßig gut in allen Proben vorhanden. Diese Transkription scheint jedoch bei Zugabe von PAA, d.h. in der frühen Infektionsphase, wieder abgeschaltet zu werden, und die vorhandene 3.5-kb-RNA wird rasch wieder abgebaut. Das würde bedeuten, daß ein frühes Protein oder das von diesem immediate early Transkript translatierte Protein selbst die Transkription hemmen kann. Bei den zwei weiteren Transkripten sieht dies anders aus: hier beginnt die Synthese unter Cycloheximid-Bedingungen, sie setzt sich jedoch bis in die späteren Phasen fort, sogar mit einer gesteigerten Produktion der beiden RNAs. Daraus kann gefolgert werden, daß die beiden letzteren

Produkte vorwiegend in den späteren Stadien benötigt werden, während das 140-kDa-Protein nur in der Frühphase eine Rolle spielt. Was die Funktion anbelangt, so wäre es aufgrund dieser zeitlich begrenzten Synthese denkbar, daß es als Immediate early Transaktivator wirkt wie vergleichsweise das ICP4 bei HSV und IE1/IE2 bei HCMV, was allerdings erst durch eine Funktionsanalyse (CAT-assay u.ä.) gezeigt werden kann. Die Proteine von 94 kDa und 30 kDa bzw. eines davon könnten demzufolge speziell auf spätere Gene transaktivierend wirken, falls ihnen überhaupt eine solche Funktion zukommt.

Die Immediate early Genexpression von Herpesvirus saimiri ist auch von anderen Arbeitsgruppen in den letzten Jahren untersucht worden mit zum Teil konträren Ergebnissen. Bodemer et al. (1984) beschrieben ein 2.5 kb langes Transkript im KpnI-D-Fragment als einziges Genprodukt unter Cycloheximid-Hemmung. In nachfolgenden Arbeiten wurde die kodierende Region mit dem entsprechenden Leserahmen sequenziert, und es zeigte sich aufgrund von Aminosäure-Sequenzvergleichen, daß es sich bei dem dazugehörigen Protein von ca 33 kDa um eine Thymidylat-Synthase handelt (BODEMER et al. 1986). Diese Funktion konnte durch in vivo Versuche bestätigt werden (HONESS et al. 1986). Ein solches Transkript in KpnI D (und dem überlappenden EcoRI C) wurde auch in den eigenen Experimenten gefunden (siehe Abb. 26), massiv synthetisiert in der frühen und in der späten Phase der Virusreplikation, allerdings nicht Immediate early. Die starke Expression dieses Gens könnte dazu geführt haben, daß es bei unvollständigem Cycloheximid-Block irrtümlich als Immediate early eingestuft wurde. Eine zusätzliche Funktion als Transaktivator kann bei einem so stark konservierten Enzym (Homologie zu Thymidylat-Synthasen von E. coli, Lactobacillus casei, VZV, Mensch u.a.) nicht erwartet werden, wohingegen seine enzymatische Wirkung innerhalb des Nucleotidstoffwechsels für eine Einreihung unter die frühen, zur DNA-Replikation beitragenden Proteine spricht. Die Arbeitsgruppe von R. Honess fand durch in vivo Markierungsexperimente und Immunpräzipitation mit einem passenden monoklonalen Antikörper (SB) ein anderes virales Protein von 52 kDa als Hauptprodukt unter Cycloheximid-Behandlung. Durch die eigenen Versuche mit dem gleichen monoklonalen Antikörper konnte dieses Protein auf den Fragmenten EcoRI I/E kartiert werden (55 kDa in den eigenen Ergebnissen). Die dazu korrelierte RNA von 2.0 kb Länge wurde durch Northern Blot Hybridisierung gefunden (Abb. 26). Diese ist in PAA-RNA sowie in später GesamtRNA ebenfalls relativ stark vertreten, fehlt wiederum bei allen Immediate early RNA-Proben. Hier gilt ähnliches wie für die Thymidylat-Synthase: eine sofortige Synthese nach Aufhebung des Cycloheximid-Blocks könnte bei in vivo Markierung einen Immediate-early-Status vortäuschen. Die Sequenzierung

dieser Region erbrachte eine Homologie des 52-kDa/55-kDa-Produkts auf Aminosäure-Ebene zu dem im Leserahmen BMLF1 kodierten EBV-Protein, einem transaktivierenden Faktor im EBV-System (NICHOLAS et al. 1988). Ebenso sind das ICP27 von HSV 1 und das mit IE68 bezeichnete Protein von VZV homolog. Für das HVS-Produkt konnte gleichfalls transaktivierende Wirkung auf verschiedene (heterologe) Promotoren nachgewiesen werden (NICHOLAS et al. 1988). Dies führt zu der Hypothese, daß das 55-kDa-Protein eine Art von Haupt-Transaktivator für frühe und späte Gene darstellen könnte, der aber zunächst selbst von dem 140 kDa großen immediate early Produkt angeschaltet werden muß. Für das homologe ICP27 von HSV1 wurde bereits nachgewiesen, daß es in erster Linie auf die späten Gene transaktivierend wirkt (SACKS et al. 1985). Das IeED-Produkt hätte also allein oder bevorzugt die Aufgabe, das zweite transaktivierende Genprodukt anzuschalten, wodurch die geringe Synthese des 140-kDa-Proteins erklärt werden könnte.

Abgesehen von der Funktion der identifizierten immediate early Produkte stellt sich auch die Frage, wie diese selbst aktiviert werden. Ein Kapsidfaktor wie das ICP25 (=Vmw 65) bei HSV (CAMPBELL et al. 1984) konnte bei Herpesvirus saimiri ebenso wie bei EBV bislang nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise geschieht die Stimulation durch zelluläre Faktoren, abhängig vom Differenzierungsstatus der jeweiligen Wirtszellen oder als Antwort auf exogene Faktoren wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Interleukin-artige Substanzen. Bei EBV gibt es Hinweise auf solche differenzierungsabhängige Mechanismen (BECKER et al. 1988).

3. Frühe und späte Genprodukte:

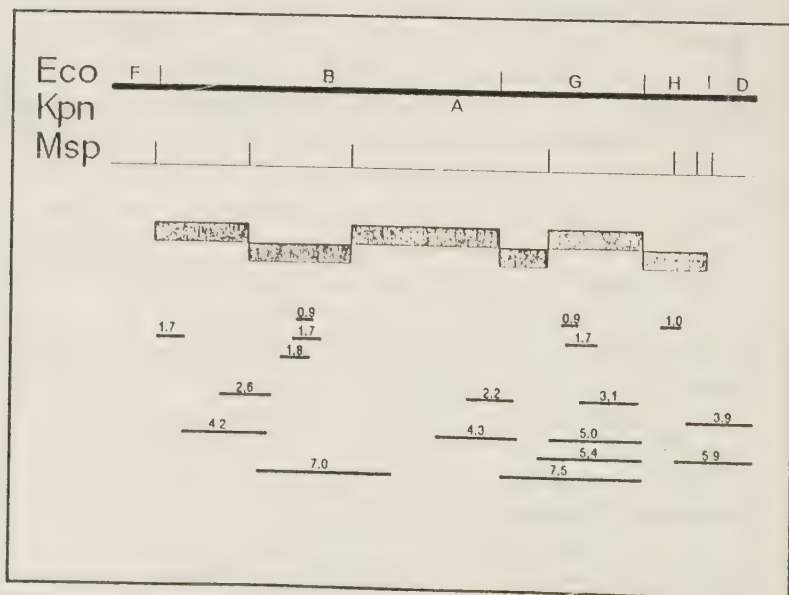
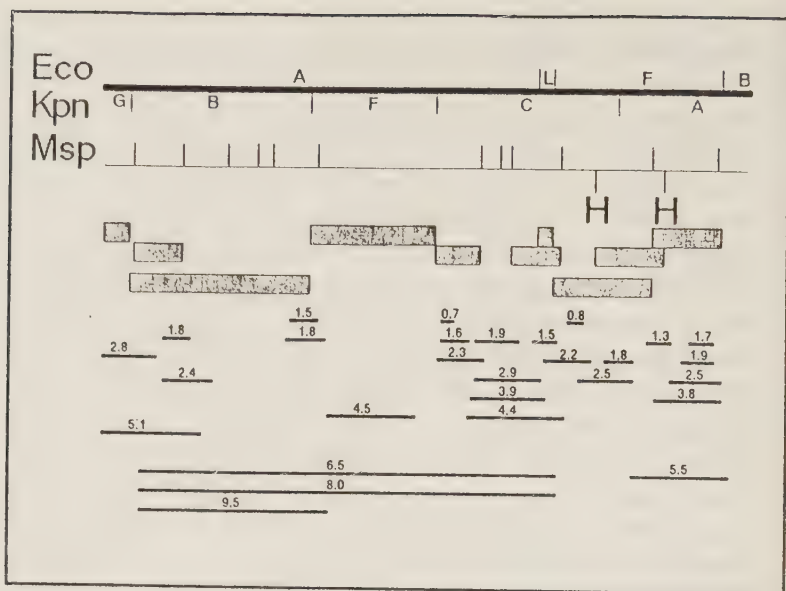
Die Ergebnisse aus der Analyse von Northern Blots sowie von in vitro Translationen hybrid-selektierter RNAs sind in den Abb. 28 und 29 in schematischer Übersicht dargestellt und sollen im folgenden unter Berücksichtigung von Daten aus anderen Arbeiten diskutiert werden. Dabei sollen die Abschnitte auf dem Genom von links nach rechts angesprochen werden. Das Genom von Herpesvirus saimiri ist in den Schemata von links nach rechts in 4 Abschnitte unterteilt, die Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoRI, KpnI und MspI sind eingezeichnet (zusätzlich einzelne für die Unterteilung der Fragmente wichtige Schnittstellen von HindIII (=H), BamHI (=B), XhoI (=X)). Die ermittelten kodierenden Bereiche für die RNAs und Proteine sind durch schwarze Balken bzw. durch offene (späte Proteine) oder graue (frühe Proteine) Rechtecke angedeutet.

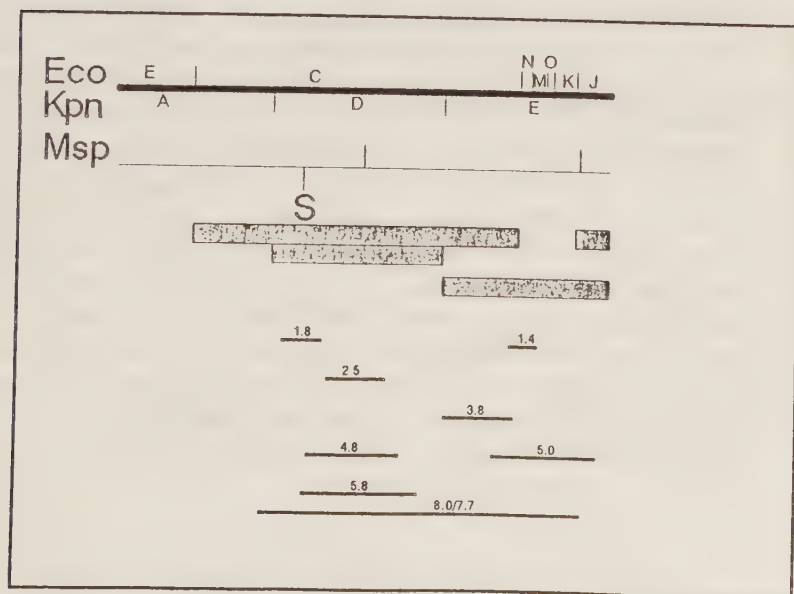
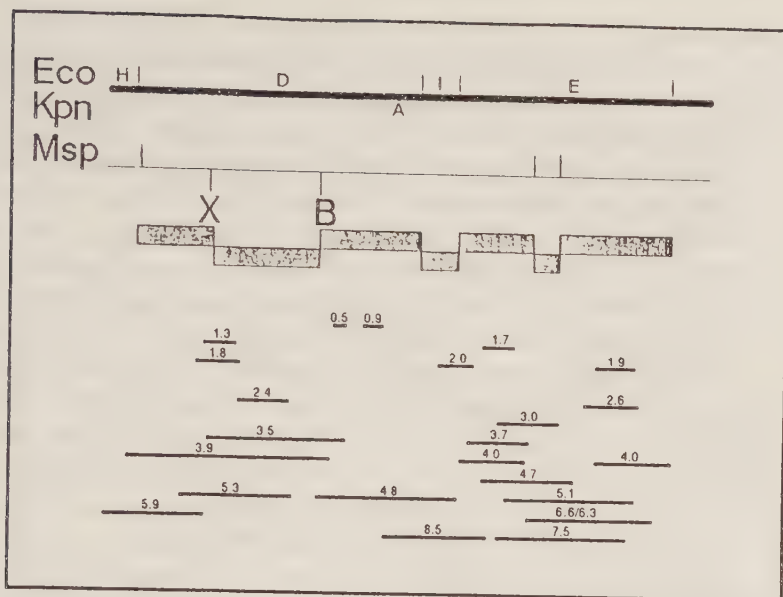
Soweit möglich wird versucht, Protein-Daten und RNA-Daten miteinander zu korrelieren, wobei es festzuhalten gilt, daß eine Korrelation mit letzter Sicherheit nur über eine cDNA-Klonierung zu erreichen ist.

Am linken Rand der L-DNA, im Bereich KpnI G/B finden sich bei verschiedenen attenuierten Stämmen von Herpesvirus saimiri (11att, SMH1att) sowie bei rekombinanten Virusmutanten (S4 und KH3) Deletionen von unterschiedlicher Größe, die im Falle von 11att, SMH1att und S4 dazu führen, daß diese Stämme nicht mehr oncogen bzw. in vitro transformierend sind (DESROSIERES et al. 1986). KH3 dagegen reagiert wie der Wildtypstamm 11. Die lytische Vermehrung in Zellkultur wird bei den genannten Deletionsmutanten nicht beeinträchtigt, ein Phänomen, das beispielsweise auch bei HSV beobachtet wurde: Dort können in der U_S-Untereinheit des Genoms 9 Gene ohne Beeinträchtigung der Virusvermehrung in Zellkultur deletiert sein (LONGNECKER und ROIZMAN 1987). Am linken Genomrand von HVS wurden inzwischen etwa 5000 bp sequenziert (R. Desrosiers, pers. Mitt.), wobei zwei Leserahmen gefunden wurden. Bezogen auf die Oncogenität des Virus scheint hier der äußerste Leserahmen, ORF1 genannt, bzw. das davon kodierte Protein von ca 20 kDa (nach Aminosäure-Sequenz) eine entscheidende Rolle zu spielen (R. Desrosiers, pers. Mitteilung), denn genau dieser Leserahmen fehlt in den nicht oncogenen Deletionsmutanten 11att und S4 (SMH1att wurde nicht untersucht). In KH3 sind nur 600 bp deletiert, die den ORF1 nicht betreffen; allerdings findet sich ein verkürztes Transkript (Abb. 25) in Northern Blots. Nach den eigenen Ergebnissen der in vitro Translation ist das vom ORF1 kodierte Protein identisch mit dem 25-kDa-Translationsprodukt in KpnI G/B. Es fehlt bei der in vitro Translation von RNA aus S4-infizierten OMK-Zellen (Abb. 6). Die Funktion dieses Proteins ist bisher nicht untersucht, es könnte von der Aminosäuresequenz her ein Membranprotein sein. Im Infektionszyklus taucht es erst spät in den Zellen auf. Daß es für die Oncogenität eine entscheidende Rolle spielt, geht aus den Versuchen mit den Deletionsmutanten hervor, ob es der allein verantwortliche Faktor dafür ist, bleibt noch zu klären. In den von Herpesvirus saimiri transformierten Zelllinien, soweit untersucht, ist seine Produktion nicht nachgewiesen worden.

Abb. 28 (auf den nächsten Seiten): Schematische Darstellung der HVS-spezifischen Transkripte

Das HVS-Genom (L-DNA) ist wie in Abb. 24, in 4 Abschnitte unterteilt, mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen dargestellt. Die durch Hybridisierung von Northern Blots gefundenen Transkripte sind mit schwarzen Balken unter den jeweiligen kodierenden Regionen eingezeichnet. Die Längenangaben sind in kb, frühe mRNAs sind mit einem Stern, immediate early RNAs mit zwei Sternen gekennzeichnet.



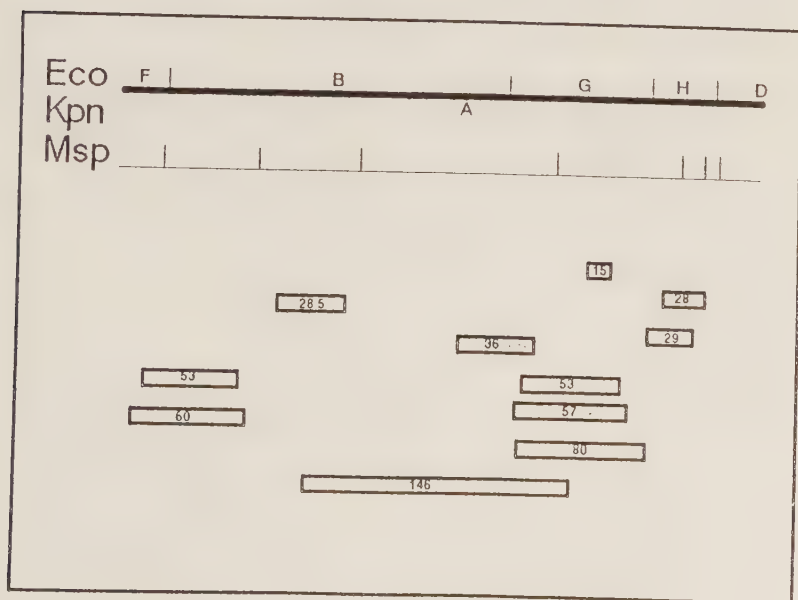
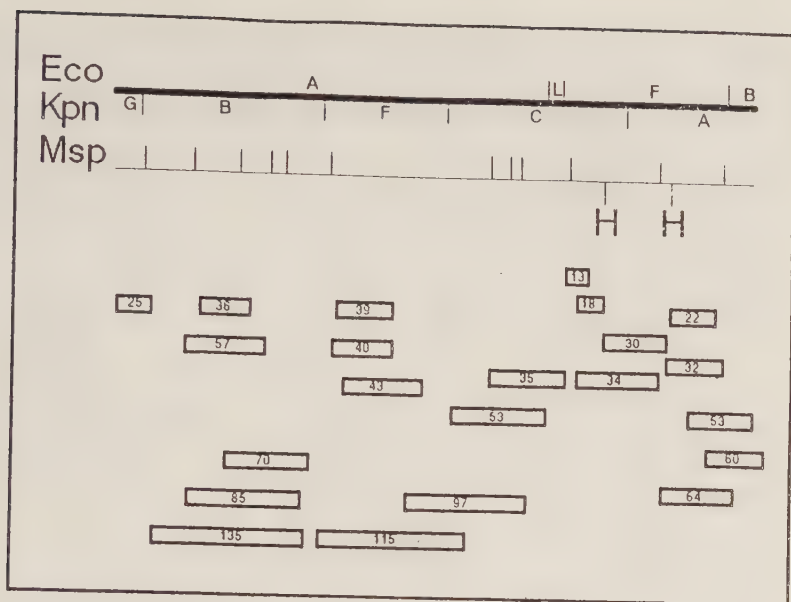


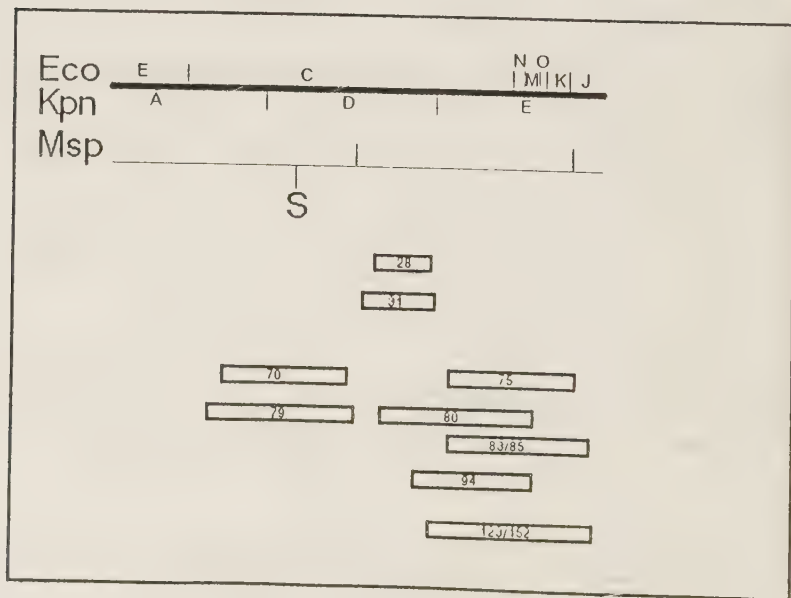
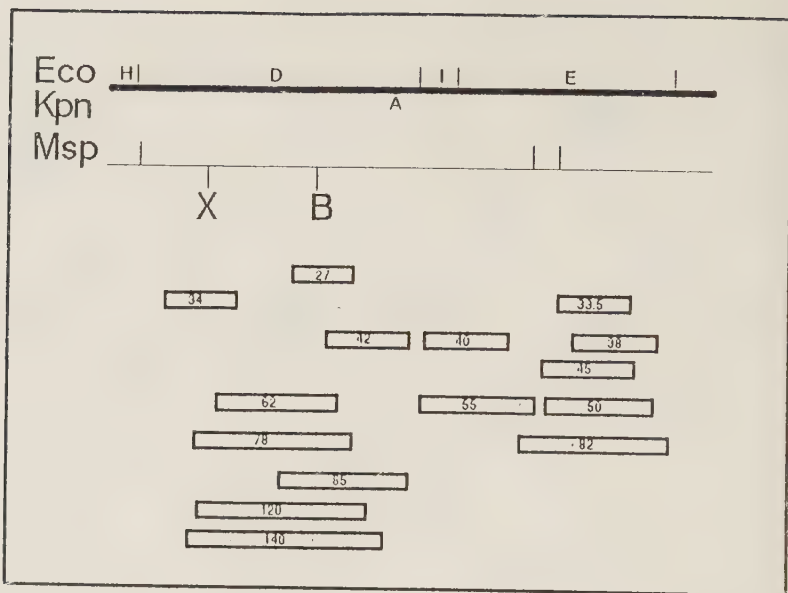
Der in der DNA-Sequenz nächstfolgende Leserahmen (ORF2) kodiert für eine Dihydrofolat-Reduktase (TRIMBLE et al. 1988). Eine Korrelation mit den in vitro Translationsprodukten und mit den in diesem Bereich gefundenen Transkripten konnte hierfür nicht erreicht werden. Als zugehöriges Polypeptid kommt von der Größe her das 36-kDa-Produkt in Betracht. Neben diesem kodieren in KpnI B noch andere späte Proteine (36, 57, 70, 85 und 135 kDa), von denen das 135 kDa durch einen Monoklonalen Antikörper (DE) am besten charakterisiert ist. Es bindet unspezifisch an DNA (R. Honess, pers. Mitteilung). In KpnI F kodiert das 115 kDa große DNA-bindende Protein, das zu den frühen Genprodukten gehört und mit Antisera sowie mehreren monoklonalen Antikörpern präzipitierbar ist. Auch Antisera gegen das Haupt-DNA-bindende Protein p138 von EBV reagierten mit diesem Polypeptid (siehe Abb. 18), was ein Beweis für die Homologie zwischen beiden ist. Auch bei VZV und HSV finden sich Homologe zu dem p138, das bedeutet, daß diesen stark konservierten Proteinen eine wichtige Funktion, vermutlich innerhalb der DNA-Replikation, zukommt. Der kodierende Bereich für das 115-kDa-Protein reicht links und rechts in die angrenzenden KpnI-Fragmente B und C hinein, das zugehörige Transkript ist vermutlich die 4,5-kb-RNA, die in der Frühphase der Infektion stark exprimiert wird. In KpnI F liegen weitere drei Proteine, die zu den späten Produkten gehören (39 kDa, 40 kDa, 43 kDa).

Im Übergangsbereich zwischen KpnI F und KpnI C liegt das Gen für das späte Strukturprotein von 97 kDa, das vor allem durch das gegen Viruspartikel gerichtete RI-Serum erkannt wird. Die angrenzenden Regionen von KpnI C, EcoRI L, EcoRI F und HindIII G kodieren vor allem für einige frühe Proteine. Dazu gehören das leEF-Produkt (s. o.) sowie Proteine von 34 kDa und 35 kDa. Zu letzterem gehört eine RNA von 2,9 kb, die in dem Bereich von EcoRI L kartiert werden konnte. Das 34-kDa-Protein und die vermutlich dazugehörige 2,5-kb-RNA kodieren rechts davon in EcoRI F bzw. HindIII G. Im rechten Abschnitt von EcoRI F liegen noch mehrere späte Gene (für 22, 32, 53, 60 und 64 kDa), die zum Teil in EcoRI B hineinreichen. Im großen EcoRI-B-Fragment kodieren zwei Strukturproteine, das eine ist 145 kDa groß, wird spät synthetisiert und gehört wahrscheinlich zu einer mRNA von 7,0 kb. Besonders stark wird in der späten

Abb. 29 (auf den nächsten Seiten): Schematische Darstellung der virus-spezifischen Polypeptide

Das HVS-Genom ist in gleicher Weise wie in Abb. 28 dargestellt. Frühe Proteine sind mit grauen Rechtecken, späte sind mit weißen Rechtecken sowie mit dem Molekulargewicht in kDa unter den entsprechenden kodierenden Regionen eingezeichnet.





Phase das 36-kDa-Polypeptid synthetisiert, dessen kodierende Region bis in EcoRI G hineinreicht. Dieses Gen wird schon in der frühen Phase transkribiert, d.h. auch bei Hemmung mit PAA. Das Transkript dazu ist vermutlich die 2.2-kb-RNA, die mit dem EcoRI-B- und EcoRI-G-Fragment hybridisiert. Außerdem findet sich in EcoRI B eine weitere frühe RNA von 4.2 kb, die in späteren Phasen fast nicht mehr zu sehen ist. Ein dazu passendes Polypeptid konnte nicht gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich um eine Vorläufer-RNA aus dem Zellkern, wie überhaupt einige größere RNAs, die bei der Hybridisierung der Northern Blots gefunden wurden, noch nicht prozessierte nukleäre Transkripte (hnRNAs) darstellen könnten.

Im Bereich EcoRI G ist besonders stark ein frühes Protein von 57 kDa exprimiert, das dazugehörige Transkript könnte die 4.3-kb-RNA sein. Weiterhin kodieren in EcoRI G drei spätere Proteine von 80, 53 und 15 kDa, neben den bereits genannten 36-kDa- und 146-kDa-Produkten am linken Rand des Fragments. Das rechts angrenzende kleinere Fragment EcoRI H enthält die Gene für ein frühes Protein von 28 kDa sowie ein spätes Protein von 29 kDa, die beide in der Immunpräzipitation sehr gut zu erkennen sind (siehe Abb. 13 und 15). Im Northern Blot findet sich eine frühe RNA von 1.0 kb, die zu dem erstgenannten Protein paßt. Dazu kommen drei späte RNAs von 2.6, 3.9 und 5.9 kb, wovon die beiden letzteren in das EcoRI-D-Fragment hineinreichen.

Im Fragment EcoRI D kodiert das leED genannte Immediate early Produkt (s. o.) sowie einige weitere frühe Genprodukte. Frühe Proteine von 62 kDa und 34 kDa werden sehr stark synthetisiert und sind wohl mit RNAs von 2.4 und 1.3 kb zu korrelieren. Das 34-kDa-Polypeptid könnte nach der Immunpräzipitation mit dem RI-Serum zu urteilen ein Strukturprotein sein (siehe Abb. 14). Ein weiteres spätes Protein von 120 kDa ist ohne Immunpräzipitation kaum zu entdecken, wird aber durch einen der monoklonalen Antikörper (SC) erkannt. Es ist mit dem zweiten großen Protein in dieser Region, dem 140 kDa großen immediate early Protein, nicht homolog. Die gefundenen RNAs in diesem Fragment können bis auf das Immediate early Transkript ohne weitere Analyse nicht zugeordnet werden. Im nächstfolgenden Fragment EcoRI I konnten in der *in vitro* Translation zwei Polypeptide von 55 kDa und 40 kDa identifiziert werden, wobei das zweite ein Produkt unvollständiger Translation sein könnte. Nach der bereits publizierten DNA-Sequenz dieses Stückes (NICHOLAS et al. 1988) läßt sich nur ein Leserahmen für das 55-kDa-Produkt erkennen, der nach rechts bis in EcoRI E hineinragt, sowie ein größerer offener Leserahmen, der in das linke EcoRI-D-Fragment hineinreicht. Beide Leserahmen zeigen Homologien zu EBV-Leserahmen. Bei dem 55-kDa-Produkt handelt es sich um ein Homolog zu dem

transaktivierenden BMLF1-Protein (s. o.). Es ist neben dem 50-kDa-Protein, das im benachbarten Fragment EcoRI E kodiert, in der frühen Infektionsphase (8 - 10 Std) unter allen viralen Genprodukten am stärksten exprimiert (siehe Abb. 11). Beide frühe Proteine werden auch von monoklonalen Antikörpern (SB bzw. DI) erkannt. Wie das 55-kDa-Protein (RNA von 2.0 kb) ist auch das benachbarte 50-kDa-Produkt (RNA von 3.0 kb) homolog zu einem EBV-Genprodukt, nämlich das mit dem Leserahmen BMRF1 korrelierte. Es ist eines der beiden Haupt-DNA-bindenden Proteine von HVS. Weitere frühe in EcoRI E kodierende Proteine sind 33.5 kDa, 38 kDa, 40 kDa und 82 kDa groß, frühe Transkripte dazu sind die RNAs von 4.0, 6.3 und 6.6 kb Länge.

Der rechte Randbereich des HVS-Genoms von EcoRI C bis zu KpnI E enthält Gene für ganz unterschiedliche Proteine. Zum einen kodiert im Bereich zwischen dem KpnI-D-Fragment und den kleineren Stücken EcoRI N - J das dritte Immediate early Genprodukt (Protein 94 kDa, RNA 3,8 kb, s. o.), dazu kommt als äußerster rechter Leserahmen das späte 152 kDa große Tegumentprotein (CAMERON et al. 1988), das zu einem EBV-Protein von ähnlicher Größe und Funktion homolog ist (Leserahmen BNRF1). Ein drittes gut charakterisiertes Genprodukt ist die Thymidylat-Synthase (Protein 31 kDa, RNA 2,5 kb), die am rechten Rand von KpnI D kodiert und in den frühen wie späten Phasen der Infektion das mit Abstand am stärksten synthetisierte virale Produkt in den infizierten Zellen ist. Vor allem in den Northern Blots zeigt sich die übermäßige Expression dieses Gens. Warum solch große Mengen dieser RNA in den infizierten Zellen vorliegen, konnte noch nicht geklärt werden. Möglicherweise wirkt eine Enhancer-Sequenz weiter rechts von diesem Gen aktivierend (SCHIRM et al. 1985), möglich wäre auch, daß die Expression dieses Gens den virus-spezifischen Regulationsmechanismen nicht vollkommen untergeordnet ist. Hinzu kommt, daß der außergewöhnlich lange 5'-untranslatierte Teil der mRNA (BODEMER et al. 1986) aufgrund von internen Zusammenlagerungen den Abbau des Transkripts in den Zellen behindern könnte, was ebenfalls die große Anreicherung erklären könnte. Interessant ist, daß bei einer Analyse der Genexpression in der HVS-transformierten Zelllinie 1670 das Thymidylat-Synthase-Transkript als einzige mRNA gefunden wurde (KNUST et al. 1983a), was auf eine Beteiligung dieses Enzyms an der Transformation oder aber auf eine unregulierte Expression des Gens hindeutet.

Weitere späte Proteine von 70 kDa, 75 kDa, 80 kDa und 85 kDa sowie ein frühes 79-kDa-Produkt sind ebenfalls in EcoRI C bzw. KpnI E kodiert. Die gefundenen RNAs können bislang nicht eindeutig zugeordnet werden. Möglich wäre

auch, daß letztgenannte Polypeptide nur Teilprodukte in der *in vitro* Translation sind.

Bei der Analyse der Genprodukte durch *in vitro* Translation muß davon ausgegangen werden, daß nicht alle viruskodierten Polypeptide erfaßt werden konnten. Bei geringer Synthese von Virusprodukten ist eine besonders effiziente Anreicherung der RNAs nötig, um bei Hybrid-Selektion und *in vitro* Translation ein Ergebnis zu erhalten. Auch kann die mögliche Überlappung von Leserahmen sowie die Verwendung von größeren Genomfragmenten in der Hybrid-Selektion eine Anreicherung von Transkripten beeinträchtigen. Zudem sind RNAs mit einer hohen Abbaurate in den Zellen schwer zu erfassen. Eine vollständige Analyse wäre etwa zu erreichen durch Klonierung und Untersuchung einer ausreichend großen cDNA-Library ausgehend von mRNAs aus verschiedenen Stadien infizierter Zellen. Dennoch zeigt ein Vergleich der *in vivo* identifizierten HVS-Proteine (MODROW 1983) mit den hier aufgeführten *in vitro* Ergebnissen, daß in beiden Fällen qualitativ ein sehr ähnliches Proteinprofil gefunden wurde, wobei quantitative Unterschiede durch die Anreicherung bestimmter RNAs *in vitro* sowie durch zusätzliche Modifikation von Polypeptiden *in vivo* bzw. durch Unterschiede translationeller Art im Retikulozytenlysat und in den infizierten Zellen hervorgerufen wurden.

4. Homologien zu anderen Herpesviren:

Nachdem neben der DNA-Sequenz von EBV auch diejenigen von VZV und HSV1 veröffentlicht worden waren, konnte man anhand der Aminosäuresequenz einige homologe Proteine (bzw. Leserahmen) zwischen diesen humanpathogenen Herpesviren finden, obwohl sie beispielsweise vom GC-Gehalt her deutliche Unterschiede aufwiesen. Daraus kann geschlossen werden, daß einige Proteine im Herpesvirus-System doch stark konserviert sind und von gemeinsamen Vorgängern abstammen. Diese Homologien betreffen vor allem enzymatische Funktionen wie DNA-Polymerase, Haupt-DNA-bindendes Protein und auch ein immediate early bzw. transaktivierendes Protein (s. o.), aber man hat ebenso Homologien unter Glykoproteinen, also strukturellen Komponenten, gefunden. Rechnet man die etwas weniger deutlichen Homologien hinzu, so lassen sich innerhalb der Herpesvirus-Genome Gen-Blöcke identifizieren, die bei den drei genannten Viren verschieden zueinander angeordnet sind (DAVISON und TAYLOR 1987; GOMPELS et al. 1988). Hinzu kommen dann einzelne Gene wie diejenigen der Thymidylat-Synthase, Dihydrofolat-Reduktase u.a., die vermutlich erst spät in der Evolution in das

Genom integriert wurden. So läßt sich z.B. erklären, daß VZV als ein alpha-Herpesvirus und Herpesvirus saimiri aus der gamma-Gruppe eine Thymidylat-Synthase besitzen, während ihre jeweiligen Verwandten, HSV bzw. EBV, dieses Enzym nicht haben. Die Dihydrofolat-Reduktase wurde bis jetzt nur bei Herpesvirus saimiri und seinem nächsten Verwandten, Herpesvirus ateles, gefunden (TRIMBLE et al. 1988). Die starke Homologie in der Aminosäure-Sequenz zwischen diesen viruskodierten Enzymen und den entsprechenden Enzymen bei Primaten spricht ebenfalls für einen nachträglichen Einbau der zugehörigen Gene in die viralen Genome. Die Herpesviren sind also offen für eine solche Adaptation von zellulären Genen und haben vielleicht auch auf diesem Weg Gene integriert, die, wie etwa bei Herpesvirus saimiri das 25 kDa große ORF1-Produkt in KpnI G/B, für eine Virusreplikation nicht notwendig sind, die aber unter anderem zu einer oncogenen Transformation der Wirtszellen beitragen können. Ein weiteres Indiz dafür ist die hohe Variabilität der DNA-Sequenz zwischen verschiedenen HVS-Stämmen gerade in diesem für das 25-kDa-Protein kodierenden Bereich, verbunden mit unterschiedlichem oncogenen Potential dieser Stämme, d.h. Mutationen können hier in hohem Maße toleriert werden, weil die Virusreplikation in permissiven Zellen nicht beeinträchtigt wird.

Da von Herpesvirus saimiri bisher nur einige kleinere Abschnitte sequenziert wurden, kann noch nicht genau abgeschätzt werden, wieviel homologe Proteine zu anderen Herpesviren existieren. Die genannten immunologischen Kreuzreaktionen (siehe Erg. 4.) geben Hinweise auf einige Homologien von Proteinen bei EBV und Herpesvirus saimiri. Honess und Mitarbeiter haben punktuell an verschiedenen Stellen des Genoms kurze Stücke sequenziert und mit dem EBV auf Aminosäure-Ebene verglichen (GOMPELS et al. 1988), wobei sich zeigte, daß doch eine größere Zahl von Leserahmen homologe Gegenstücke bei EBV haben. Anhand der veröffentlichten Sequenzen ist mit Sicherheit das 152 kDa große Tegumentprotein, kodierend am rechten Rand des Genoms (EcoRI C/J und KpnI E), homolog mit dem Strukturprotein p143 von EBV (BNRF1) (CAMERON et al. 1987). Dazu kommen die beiden frühen Proteine von 55 kDa und 50 kDa in EcoRI I und E, sie sind homolog zu den BMLF1- bzw. BMRF1-Produkten von EBV. Auch die Haupt-DNA-bindenden Proteine, 115 kDa in KpnI F (Herpesvirus saimiri) und p138 (EBV), sind sicherlich homolog und zeigen außerdem eine Verwandtschaft zu entsprechenden Proteinen von HSV und VZV. Zu erwarten ist dies ebenso für die DNA-Polymerase, die bei Herpesvirus saimiri bislang nicht kartiert wurde. Die Homologie zwischen p138 und dem HVS-115-kDa-Protein konnte durch Kreuzreaktionen in der Immunpräzipitation mit entsprechenden Antisera (siehe Abb. 18) deutlich gezeigt werden. Hingegen wurde dabei kein HVS-Homolog zu

dem gp350/250 von EBV gefunden, was damit zu erklären ist, daß dieses Glykoprotein bei der Infektion mit dem EBV-spezifischen Rezeptor CR2 reagiert und deswegen bei dem für B-Lymphozyten nicht infektiösen HVS nicht zu erwarten ist, weil hier ein anderer, bislang noch nicht bekannter Rezeptor und damit auch ein anderes virales Gegenstück vorliegen müssen.

Daneben sind noch weitere Proteine von Herpesvirus saimiri bekannt, die keine entsprechenden Gegenstücke bei EBV haben. So gibt es bei EBV keine Thymidylat-Synthase, und zu dem ORF1-Produkt sowie zu dem 30-kDa-Protein in EcoRI F / HindIII G sind keine Entsprechungen bei EBV gefunden wurden. Das gleiche gilt auch für die Dihydrofolat-Reduktase. Generell kann jedoch gesagt werden, daß die aufgrund der sehr ähnlichen biologischen Eigenschaften zwischen beiden Herpesviren bereits früher vermutete Verwandtschaft in den bisherigen Untersuchungen auf molekularer Ebene bestätigt wurde.

LITERATUR

- Ablashi, D. V., Loeb, W. F., Pearson, G., Valerio, M. G., Armstrong, G. R., Rabin, H., Kingsbury, E. W. und Heine, U. (1973): Induction of lymphoma in owl monkeys with heated, noncytopathogenic Herpesvirus saimiri. *Nature (London) New Biol.* 242: 28-35.
- Ablashi, D. V., Pearson, G., Rabin, H., Armstrong, G., Easton, J., Valerio, M. und Cíćmanec, J. (1978): Experimental infection of *Callithrix jacchus* marmosets with Herpesvirus ateles, Herpesvirus saimiri and Epstein-Barr virus. *Biomedicine* 29: 7-10.
- Albrecht, T. und Rapp, F. (1973): Malignant transformation of hamster embryo fibroblasts following exposure to ultraviolet-irradiated human cytomegalovirus. *Virology* 55: 53-62.
- Arrand, J. R. und Rymo, L. (1982): Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J. Virol.* 41: 376-389.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin, C., Tufnell, P. S. und Barrell, B. G. (1984): DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310: 207-211.
- Batchwal, V. R. und Sugden, B. (1988): Latency comes of age for herpesviruses. *Cell* 52: 787-789.
- Bankier, A. T., Dietrich, W., Baer, R., Barrell, B. G., Colbere-Garapin, F., Fleckenstein, B. und Bodemer, W. (1985): Terminal repetitive sequences in Herpesvirus saimiri virion DNA. *J. Virol.* 55: 133-139.
- Batterson, W. und Roizman, B. (1983): Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha-genes. *J. Virol.* 46: 371-380.
- Blair, E. D. und Honess, R. W. (1983): DNA-binding proteins specified by Herpesvirus saimiri. *J. Gen. Virol.* 64: 2697-2715.

- Blair, E. D., Randall, R. E. und Honess, R. W. (1986): Evidence that the major delayed-early DNA-binding proteins of herpesvirus saimiri are bound to DNA in vivo. *J. gen. Virol.* 67: 759-764.
- Becker, J., Leser, U., Marschall, M., Langford, A., Jilg, W., Reichart, P., Gelderblom, H. und Wolf, H. (1988): EB-viral expression depends on the differentiated status of epithelial cells in oral hairy leukoplakia. Manuskript eingereicht zur Publikation.
- Bodemer, W., Knust, E., Angermüller, A. und Fleckenstein, B. (1984): Immediate early transcription of Herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 51: 452-457.
- Bodemer, W., Niller, H.-H., Nitsche, N., Scholz, B. und Fleckenstein, B. (1986): Organization of the thymidylate synthase gene of Herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 60: 114-123.
- Bornkamm, G. W., Dellus, H., Fleckenstein, B., Werner, F.-J. und Mulder, C. (1976): The structure of Herpesvirus saimiri genomes: Arrangement of heavy and light sequences within the M genome. *J. Virol.* 19: 154-161.
- Camacho, A. und Spear, P. (1978): Transformation of hamster embryo fibroblasts by a specific fragment of the herpes simplex virus genome. *Cell* 15: 993-1002.
- Cameron, K. R., Stamminger, T., Craxton, M., Bodemer, W., Honess, R. W. und Fleckenstein, B. (1987): The 160,000-M_r virion protein encoded at the right end of the herpesvirus saimiri genome is homologous to the 140,000-M_r membrane antigen encoded at the left end of the Epstein-Barr virus genome. *J. Virol.* 61: 2063-2070.
- Campbell, M. E. M., Palfreyman, J. W. und Preston, C. M. (1984): Identification of herpes simplex virus sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *J. Mol. Biol.* 180: 1-19.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. und Rutter, W. J. (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry* 18: 5294-5299.

Clanton, D. J., Jarlwalla, R. J., Kress, C. und Rosenthal, L. J. (1983): Neoplastic transformation by a cloned human cytomegalovirus DNA fragment uniquely homologous to one of the transforming regions of herpes simplex virus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3826-3830.

Cordingley, M. G., Campbell, M. E. M. und Preston, C. M. (1983): Functional analysis of a herpes simplex virus type 1 promoter; identification of far-upstream regulatory sequences. *Nucleic Acids Res.* 11: 2347-2352.

Countryman, J. und G. Miller (1985): Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4085-4089.

Dahlberg, J. E., Zintz, E. und Ablashi, D. V. (1985): Analysis of herpesvirus saimiri structural proteins with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 53: 279-286.

Daniel, M. D., Melendez, L. V., Hunt, R. D., King, N. W., Anver, M., Fraser, C. E. O., Barahona, H. und Baggs, R. B. (1974): Herpesvirus saimiri. VII. Induction of malignant lymphoma in New Zealand white rabbits. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 1803-1807.

Daniel, M. D., Silva, D. und Ma, N. (1976): Establishment of owl monkey kidney 210 cell line for virological studies. *In Vitro* 12: 290-294.

Datta, A., de Haro, C. und Ochoa, S. (1978): Translational control by hemin is due to binding to cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1148-1152.

Davison, A. J. und Scott, J. E. (1986): The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J. gen. Virol.* 67: 1759-1816.

Davison, A. J. und Taylor, P. (1987): Genetic relations between varicella-zoster virus and Epstein-Barr virus. *J. gen. Virol.* 68: 1067-1079.

Deinhardt, F., Falk, L. und Wolfe, L. (1973): Simian herpesviruses. *Cancer Res.* 33: 1424-1426.

- Deinhardt, F. und Deinhardt, J. (1979): Comparative aspects: oncogenic animal herpesviruses. In: The Epstein-Barr Virus. Eds.: M. A. Epstein, B. G. Achong, 374-415 (Springer-Verlag, Berlin).
- Desrosiers, R. C. (1981): Herpesvirus saimiri DNA in tumor cells - deleted sequences and sequence rearrangements. *J. Virol.* 39: 497-509.
- Desrosiers, R. C. (1982): Specifically unmethylated cytidylic-guanylate sites in Herpesvirus saimiri DNA in tumor cells. *J. Virol.* 43: 427-435.
- Desrosiers, R. C. und Falk, L. A. (1982): Herpesvirus saimiri strain variability. *J. Virol.* 43: 352-356.
- Desrosiers, R. C., Burghoff, R. L., Bakker, A. und Kamine, J. (1984): Construction of replication-competent Herpesvirus saimiri deletion mutants. *J. Virol.* 49: 343-348.
- Desrosiers, R. C., Bakker, A., Kamine, J., Falk, L. A., Hunt, R. D. und King, N. W. (1985): A region of the Herpesvirus saimiri genome required for oncogenicity. *Science* 228: 184-187.
- Desrosiers, R. C., Silva, D. P., Waldron, L. M. und Letvin, N. L. (1986): Nononcogenic deletion mutants of Herpesvirus saimiri are defective for in vitro immortalization. *J. Virol.* 57: 701-705.
- Falk, L. A. (1980): Biology of Herpesvirus saimiri and Herpesvirus ateles. In: Viral Oncology. Ed.: G. Klein, 813-832 (Raven Press, New York).
- Falk, L. A., Wolfe, L. G. und Deinhardt, F. (1973a): Herpesvirus saimiri: Experimental infection of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J. Natl. Cancer Inst.* 51 (1): 165-170.
- Falk, L. A., Nigida, S., Deinhardt, F., Cooper, R. W. und Hernandez-Camacho, J. I. (1973b): Brief communication: Oral excretion of Herpesvirus saimiri in captive squirrel monkeys and incidence of infection in feral squirrel monkeys. *J. Natl. Cancer Inst.* 51 (6): 1987-1989.

Falk, L. A., Wright, J., Wolfe, L. und Deinhardt, F. (1974): Herpesvirus ateles: Transformation in vitro of marmoset splenic lymphocytes. *Int. J. Cancer* 14: 244-251.

Falk, L. A., Desrosiers, R. C. und Hunt, R. D. (1980): Herpesvirus saimiri infection in squirrel and marmoset monkeys. In: *Viruses in Naturally Occurring Cancers*. Ed.: G. Todaro, M. Essex und H. zur Hausen, 137-143 (Cold Spring Harbor Press, New York).

Fleckenstein, B. und Bornkamm, G. W. (1975): Structure and function of H. saimiri DNA. In: *Oncogenesis and Herpesviruses II, Part I*. Ed.: G. de Thé, H. zur Hausen und M. A. Epstein, 145-150 (IARC Press, Lyon).

Fleckenstein, B. und Desrosiers, R. C. (1982): Herpesvirus saimiri and Herpesvirus ateles. In: *The Herpesviruses*, Vol. 1, Ed.: B. Roizman, 253-332 (Plenum Publishing Corp., New York).

Fleckenstein, B. und Wolf, H. (1974): Purification and properties of H. saimiri DNA. *Virology* 58: 55-64.

Fleckenstein, B., Bornkamm, G. W. und Ludwig, H. (1975): Repetitive sequences in complete and defective genomes of Herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 15: 398-406.

Fleckenstein, B., Müller, I. und Werner, F.-J. (1977): The presence of Herpesvirus saimiri genomes in virus-transformed cells. *Int. J. Cancer* 19: 546-554.

Fleckenstein, B., Daniel, M. D., Hunt, R. D., Werner, F.-J., Falk, L. A. und Mulder, C. (1978a): Tumor induction with DNA of oncogenic primate herpesviruses. *Nature (London)* 274: 57-60.

Fleckenstein, B., Bornkamm, G. W., Mulder, C., Werner, F.-J., Daniel, M. D., Falk, L. A. und Dellus, H. (1978b): Herpesvirus ateles DNA and its homology with herpesvirus saimiri nucleic acid. *J. Virol.* 25: 361-373.

Galloway, D. A. und McDougall, J. K. (1983): The oncogenic potential of herpes simplex viruses: Evidence for a "hit-and-run" mechanism. *Nature (London)* 302: 21-27.

- Geballe, A. P., Leach, F. S. und Mocarski, E. S. (1986): Regulation of cytomegalovirus late gene expression: gamma genes are controlled by posttranslational events. *J. Virol.* 57: 864-874.
- Glickman, J. N., Howe, J. G. und Steltz, J. A. (1988): Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J. Virol.* 62: 902-911.
- Golins, W. F. und Stinski, M. F. (1986): Expression of a human cytomegalovirus late gene is posttranscriptionally regulated by a 3'-end-processing event occurring exclusively late after infection. *Mol. Cell. Biol.* 6: 4202-4213.
- Gompels, U. A., Craxton, M. A. und Honess, R. W. (1988): Conservation of gene organization in the lymphotropic herpesviruses Herpesvirus saimiri and Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 62: 757-767.
- Green, M. (1985): Transformation and oncogenesis: DNA viruses. In: *Virology*. Ed.: B. N. Fields, 183-234 (Raven Press, New York).
- Griffin, B. E. und Karran, L. (1984): immortalization of monkey epithelial cells by specific fragments of Epstein-Barr virus DNA. *Nature* 309: 78-82.
- Hayward, G. S. und Reyes, G. R. (1983): Biochemical aspects of transformation by herpes simplex viruses. In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 3. Ed.: G. Klein, 271-306 (Raven Press, New York).
- Honess, R. W. und Roizman, B. (1974): Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14: 8-19.
- Honess, R. W. und Watson, D. H. (1977): Herpes simplex virus resistance and sensitivity to phosphonoacetic acid. *J. Virol.* 21: 584-600.
- Honess, R. W., Bodemer, W., Cameron, K. R., Niller, H.-H., Fleckenstein, B. und Randall, R. E. (1986): The A+T-rich genome of Herpesvirus saimiri contains a highly conserved gene for thymidylate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3604-3608.

Hunt, R. D., Melendez, L. V., King, N. W., Gilmore, C. E., Daniel, M. D., Williamson, M. E. und Jones, T. C. (1970): Morphology of a disease with features of malignant lymphoma in marmosets and owl monkeys inoculated with Herpesvirus saimiri. *J. Natl. Cancer Inst.* 44: 447-465.

Hunt, R. D., Garcia, F. G., Barahona, H. H., King, N. W., Fraser, C. E. O. und Melendez, L. V. (1973): Spontaneous Herpesvirus saimiri lymphoma in an owl monkey. *J. Infect. Dis.* 127: 723-725.

Hunt, R. D., Daniel, M. D., Baggs, R. B., Blake, B. J., Silva, D., DuBose, D. und Melendez, L. V. (1975): Clinico-pathologic characterization of Herpesvirus saimiri malignant lymphoma in New Zealand white rabbits. *J. Natl. Cancer Inst.* 54 (6): 1401-1412.

Jariwalla, R. J., Aurellan, L. und Ts'o, P. O. P. (1983): Immortalization and neoplastic transformation of normal diploid cells by defined cloned DNA fragments of herpes simplex virus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5902-5906.

Kaschka-Dierich, C., Werner, F.-J., Bauer, I. und Fleckenstein, B. (1982): Structure of non-integrated circular Herpesvirus saimiri and Herpesvirus atelae genomes in tumor cell lines and in vitro-transformed cells. *J. Virol.* 44: 295-310.

Kell, G., Müller, I., Fleckenstein, B., Koomey, J. M. und Mulder, C. (1980): Generation of recombinants between different strains of Herpesvirus saimiri. In: *Viruses In Naturally Occurring Cancer*. Ed.: H. zur Hausen, G. Todaro und M. Essex, 145-161 (Cold Spring Harbor Press, New York).

Kell, G., Fleckenstein, B. und Bodemer, W. (1983): Structural proteins of Herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 47: 463-470.

King, N. W. und Melendez, L. V. (1972): The ultrastructure of Herpesvirus saimiri-induced lymphoma in cotton-top marmosets (*Saguinus oedipus*). *Lab. Invest.* 26: 682-693.

Klein, G. (1983): Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. *Cell* 32: 311-322.

Klein, G., Pearson, G., Rabson, A., Ablashi, D. V., Falk, L., Wolfe, L., Deinhardt, F. und Rabin, H. (1973): Antibody reactions to Herpesvirus saimiri (HVS)-induced early and late antigens (EA and LA) in HVS-infected squirrel marmosets and owl monkeys. *Int. J. Cancer* 12: 270-289.

Knipe, D. M. (1982): Cell growth transformation by herpes simplex virus. *Prog. Med. Virol.* 28: 114-121.

Knust, E., Dietrich, W., Fleckenstein, B. und Bodemer, W. (1983a): Virus-specific transcription in a Herpesvirus saimiri-transformed lymphoid tumor cell line. *J. Virol.* 48: 377-383.

Knust, E., Schirm, S., Dietrich, W., Bodemer, W., Kolb, E. und Fleckenstein, B. (1983b): Cloning of Herpesvirus saimiri DNA fragments representing the entire L-region of the genome. *Gene* 25: 281-289.

Knutson, J. und Sugden, B. (1988): immortalization of B-lymphocytes by Epstein-Barr virus: What does the virus contribute to the cell? In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 8, Ed.: G. Klein (Raven Press, New York).

Koomey, J. M., Mulder, C., Burkhoff, R. L., Fleckenstein, B. und Desrosiers, R. C. (1984): Deletion of DNA sequences in a nononcogenic variant of Herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 50: 662-665.

Kristle, T. M. und Roizman, B. (1984): Separation of sequences defining basal expression from those conferring alpha-gene recognition within the regulatory domains of herpes simplex virus 1 alpha-genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4065-4069.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-684.

Laufs, R. und Fleckenstein, B. (1973): Susceptibility to Herpesvirus saimiri and antibody development in Old and New World monkeys. *Med. Microbiol. Immunol.* 158: 227-236.

Laufs, R., Steinke, H., Steinke, G. und Petzold, D. (1974): Latent infection and malignant lymphoma in marmosets (*Callithrix jacchus*) after infection with two oncogenic herpesviruses from primates. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 195-202.

Lenoir, G. M. und Bornkamm, G. W. (1986): Burkitt's lymphoma, a human cancer model for the study of the multistep development of cancer: proposal for a new scenario. In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 6, Ed.: G. Klein, 173-206 (Raven Press, New York).

Longnecker, R. und Roizman, B. (1987): Clustering of genes dispensable for growth in culture in the S component of the HSV-1 genome. *Science* 236: 573-576.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, New York).

Marczynska, B., Falk, L., Wolfe, L. und Delnhardt, F. (1973): Transplantation and cytogenetic studies of Herpesvirus saimiri-induced disease in marmoset monkeys. *J. Natl. Cancer Inst.* 50: 331-337.

Mark, W. und Sugden, B. (1982): Transformation of lymphocytes by Epstein-Barr virus requires only one-fourth of the viral genome. *Virology* 122: 431-443.

Marschall, M., Leser, U., Seibl, R. und Wolf, H. (1988): Identification of proteins encoded by Epstein-Barr virus trans-activator genes. *J. Virol.*, im Druck.

McGeoch, D. J., Dolan, A., Donald, S. und Rixon, F. J. (1985): Sequence determination and genetic content of the short unique region of the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Mol. Biol.* 181: 1-13.

McGeoch, D. J., Dalrymple, M. A., Davison, A. J., Dolan, A., Frame, M. C., McNab, D., Perry, L. J., Scott, J. E. und Taylor, P. (1988): The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. gen. Virol.* 69: 1531-1574.

Medveczky, P., Szomolanyi, E., Desrosiers, R. C. und Mulder, C. (1984): Classification of Herpesvirus saimiri into three groups based on extreme variation in a DNA region required for oncogenicity. *J. Virol.* 52: 938-944.

Medveczky, M. M., Szomolanyi, E., Hesselton, R., DeGrand, D., Geck, P. und Medveczky, P. G. (1988): Herpesvirus salmirl strains from three DNA subgroups have different oncogenic potential in New Zealand White Rabbits. J. Virol., eingereicht zur Publikation.

Melendez, L. V., Daniel, M. D., Hunt, R. D. und Garcia, F. G. (1968): An apparently new herpesvirus from primary kidney cultures of the squirrel monkey (*Salmirl sciureus*). Lab. Anim. Care 18 (3): 374-381.

Melendez, L. V., Hunt, R. D., Daniel, M. D., Garcia, F. G. und Fraser, C. E. O. (1969): Herpesvirus salmirl. II. An experimentally induced malignant lymphoma in primates. Lab. Anim. Care 19: 378-389.

Melendez, L. V., Hunt, R. D., Daniel, M. D. und Trum, B. F. (1970): New World monkeys herpesviruses and cancer. In: Infections and Immunosuppression in Sub-human Primates. Ed.: H. Balner und W. J. B. Beveridge, 111-117 (Munksgaard, Kopenhagen).

Melendez, L. V., Hunt, R. D., Daniel, M. D., Blake, B. J. und Garcia, F. G. (1971): Acute lymphocytic leukemia in owl monkeys inoculated with Herpesvirus salmirl. Science 171: 1161-1163.

Melendez, L. V., Hunt, R. D., King, N. W., Barahona, H. H., Daniel, M. D., Fraser, C. E. O. und Garcia, F. G. (1972): Herpesvirus ateles, a new lymphoma virus of monkeys. Nature (London) New Biol. 235: 182-184.

Modrow, S. (1983): Genexpression lymphotroper Herpesviren nicht-menschlicher Primaten: Herpesvirus salmirl und Herpesvirus ateles. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Modrow, S. und Wolf, H. (1983a): Herpesvirus salmirl induced proteins in lytically infected cells. I. Time ordered synthesis. J. Gen. Virol. 64: 37-46.

Modrow, S. und Wolf, H. (1983b): Characterization of Herpesvirus salmirl and Herpesvirus ateles structural proteins. Virology 125: 251-260.

Modrow, S., Schmidt, H. und Wolf, H. (1983): Immunoprecipitation as a tool for studying humoral immunity of natural and experimental hosts of herpesvirus saimiri. *Cancer Res.* 43: 3398-3402.

Motz, M. (1986): Gentechnologische Herstellung Epstein-Barr-viraler Proteine für Diagnostik und Prävention. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Nicholas, J., Gompels, U. A., Craxton, M. A. und Honess, R. W. (1988): Conservation of sequence and function between the product of the 52-kilodalton immediate-early gene of Herpesvirus saimiri and the BMLF1-encoded transcriptional effector (EB2) of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 62: 3250-3257.

O'Hare, P. und Hayward, G. S. (1985a): Evidence for a direct role for both the 175.000- and the 110.000-molecular weight immediate-early proteins of herpes simplex virus in the transactivation of delayed-early promoters. *J. Virol.* 53: 751-760.

O'Hare, P. und Hayward, G. S. (1985b): Three trans-acting regulatory proteins of herpes simplex virus modulate immediate-early gene expression in a pathway involving positive and negative feedback regulation. *J. Virol.* 56: 723-731.

O'Hare, P. und Honess, R. W. (1983): Identification of a subset of Herpesvirus saimiri polypeptides synthesized in the absence of virus DNA replication. *J. Virol.* 46: 279-283.

O'Hare, P., Mosca, J. D. und Hayward, G. S. (1986): Multiple trans-activating proteins of herpes simplex virus that have different target promoter specificities and exhibit both positive and negative regulatory functions. In: *Cancer Cells*, Vol. 4: DNA Tumor Viruses, Eds.: M. Botchan, T. Grodzicker, P. A. Sharp, 175-188 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Pelham, H. R. B. und Jackson, R. J. (1976): An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Europ. J. Biochem.* 67: 247-256.

Rabin, H., Hopkins, R. F., Desrosiers, R. C., Ortaldo, J. R., Djeu, J. Y. und Neubauer, R. H. (1984): Transformation of owl monkey T cells in vitro with Herpesvirus saimiri. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4563-4567.

Rabson, A. S., O'Connor, G. T., Lorenz, D. E., Kirschstein, R. L., Legallais, F. Y. und Tralka, T. S. (1971): Lymphoid cell-culture line derived from lymph node of marmoset infected with Herpesvirus saimiri - preliminary report. J. Natl. Cancer Inst. 46: 1099-1109.

Randall, R. E., Honess, R. W. und O'Hare, P. (1983): Proteins specified by Herpesvirus saimiri: Identification and properties of virus-specific polypeptides in productively infected cells. J. Gen. Virol. 64: 19-35.

Randall, R. E., Newman, C. und Honess, R. W. (1984a): Isolation and characterization of monoclonal antibodies to structural and nonstructural Herpesvirus saimiri proteins. J. Virol. 52: 872-883.

Randall, R. E., Newman, C. und Honess, R. W. (1984b): A single major immediate-early virus gene product is synthesized in cells productively infected with Herpesvirus saimiri. J. Gen. Virol. 65: 1215-1219.

Randall, R. E., Newman, C. und Honess, R. W. (1985): Asynchronous expression of the immediate-early protein of Herpesvirus saimiri in populations of productively infected cells. J. Gen. Virol. 66: 2199-2213.

Rangan, S. R. S., Martin, L. N., Enright, F. M. und Allen, W. P. (1976): Herpesvirus saimiri-induced malignant lymphoma in rabbits. J. Natl. Cancer Inst. 57: 151-155.

Reisman, D. und Sugden, B. (1986): Trans-activation of an Epstein-Barr viral (EBV) transcriptional enhancer by the EBV nuclear antigen-1. Mol. Cell. Biol. 6: 3838-3846.

Robinson, R. A. und O'Callaghan, D. J. (1983): A specific viral DNA sequence is stably integrated in herpesvirus oncogenically transformed cells. Cell 32: 569-580.

Roizman, B. (1982): The family Herpesviridae. General description, taxonomy and classification. In: The Herpesviruses Vol. 1. Ed.: B. Roizman, 1-23 (Plenum Press, New York).

Roizman, B. und Furlong, D. (1974): The replication of herpesviruses. In: Comprehensive Virology Vol. 3. Eds.: H. Fraenkel-Conrat und R. R. Wagner, 229-403 (Plenum Press, New York).

Roizman, B. und Batterson, W. (1985): Herpesviruses and their replication. In: Virology, Ed.: B. N. Fields, 497-526 (Raven Press, New York).

Roizman, B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., de Thé, G., Nahmlas, A. J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. und Wolf, K. (1981): Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy. Intervirology 16: 201-217.

Rooney, C. M., Rowe, M., Wallace, L. E. und Rickinson, A. B. (1985): Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma cells not recognized by virus-specific T-cell surveillance. Nature 317: 629-631.

Rosa, M. D., Gottlieb, E., Lerner, M. R. und Steltz, J. A. (1981): Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. Mol. Cell. Biol. 1: 785-796.

Sacks, W. R., Greene, C. C., Aschman, D. P. und Schaffer, P. A. (1985): Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. J. Virol. 55: 796-805.

Sample, J., Hummel, M., Braun, D., Birkenbach, M. und Kleff, E. (1986): Nucleotide sequences of mRNAs encoding Epstein-Barr virus nuclear proteins: a probable transcription initiation site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5096-5100.

Schaffer, P. A., Falk, L. A. und Deinhardt, F. (1975): Brief communication: Attenuation of Herpesvirus salmirl for marmosets after successive passage in cell culture at 39°C. J. Natl. Cancer Inst. 55: 1243-1246.

Schirm, S., Weber, F., Schaffner, W. und Fleckenstein, B. (1985): A transcription enhancer in the herpesvirus salmirl genome. EMBO J. 4: 5463-5467.

Schwarzmann, F. (1988): Transkription von Epstein-Barr-Virus in latent und lytisch infizierten Zellen. Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Speck, S. H. und Strominger, J. L. (1985): Analysis of the transcripts encoding the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. A potentially polycistronic message generated by long-range splicing of several exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8305-8309.

Spivack, J. G. und Fraser, N. W. (1987): Detection of herpes simplex virus type 1 transcripts during latent infection in mice. *J. Virol.* 61: 3841-3847.

Stevens, J. G., Wagner, E. K., Devi-Rao, G. B., Cook, M. L. und Feldman, L. T. (1987): RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 235: 1056-1059.

Sugden, B. (1986): Latent and oncogenic infections by human herpesviruses. In: *Cancer Cells, Vol. 4: DNA Tumor Viruses*, Eds.: M. Botchan, T. Grodzicker, P. A. Sharp, 77-93 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Tomel, L. D., Noyes, I., Blocker, D., Holliday, J. und Glaser, R. (1987): Phorbol ester and Epstein-Barr virus dependent transformation of normal primary human skin epithelial cells. *Nature* 329: 73-75.

Tracy, S. und Desrosiers, R. C. (1980): RNA from unique and repetitive DNA sequences of Herpesvirus saimiri. *Virology* 100: 204-207.

Trimble, J. L., Murthy, S. C. S., Bakker, A., Grassmann, R. und Desrosiers, R. C. (1988): A gene for dihydrofolate reductase in a herpesvirus. *Science* 239: 1145-1147.

Vieira, J. und Messing, J. (1982): The pUC plasmids, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.

Wang, D., Liebowitz, D. und Kleff, E. (1985): An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43: 831-840.

Wang, F., Gregory, C. D., Rowe, M., Rickinson, A. B., Wang, D., Birkenbach, M., Klikutani, H., Kishimoto, T. und Kieff, E. (1987): Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3452-3456.

Werner, F.-J., Bornkamm, G. W. und Fleckenstein, B. (1977): Episomal viral DNA in a Herpesvirus saimiri-transformed lymphoid cell line. *J. Virol.* 22: 794-803.

Whittle, H. C., Brown, J., Marsh, K., Greenwood, B. M., Seldelin, P., Tighe, H. und Wedderburn, L. (1984): T-cell control of Epstein-Barr virus-infected B cells is lost during *P. falciparum* malaria. *Nature* 312: 449-450.

Wright, J., Falk, L. A., Collins, D. und Deinhardt, F. (1976): Brief communication: Mononuclear cell fraction carrying Herpesvirus saimiri in persistently infected squirrel monkeys. *J. Natl. Cancer Inst.* 57: 959-962.

Wright, J., Falk, L. A., Wolfe, L. G., Ogden, J. und Deinhardt, F. (1977): Susceptibility of common marmosets (*Callithrix jacchus*) to oncogenic and attenuated strains of Herpesvirus saimiri. *J. Natl. Cancer Inst.* 59: 1475-1478.

Wright, J., Falk, L. A., Wolfe, L. G. und Deinhardt, F. (1980): Herpesvirus saimiri: Protective effect of attenuated strain against lymphoma induction. *Int. J. Cancer* 26: 477-482.

Yanisch-Perron, C., Viera, J. und Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 102-119.

Yukawa, K., Klikutani, H., Owaki, H., Yamasaki, K., Yokota, A., Nakamura, H., Barszman, E. L., Hardy, R. R., Suemura, M. und Kishimoto, T. (1987): A B cell-specific differentiation antigen, CD23, is a receptor for IgE (Fd R) on lymphocytes. *J. Immunol.* 138: 2576-2580.

I. Eigene Veröffentlichungen:

- (1) Hell, W., Modrow, S. und Wolf, H.:
Gene expression of herpesvirus saimiri: RNA synthesis.
Zbl. Bakt. Hyg., A 257, 139 (1984).
- (2) Hell, W., Modrow, S., Randall, R. E. und Wolf, H.:
Studies on herpesvirus saimiri gene expression: RNA synthesis and hybrid-selected translation.
9th International Herpesvirus Workshop at the University of Washington, Seattle (1984).
- (3) Hell, W., Randall, R. E., Modrow, S. und Wolf, H.:
Charakterisierung früher und später Genprodukte von Herpesvirus saimiri.
Tagung der Sektion Virologie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie in Erlangen (1985).
- (4) Hell, W., Modrow, S. und Wolf, H.:
Mapping of herpesvirus saimiri proteins on the viral genome: I. Proteins dependent and not dependent on viral DNA synthesis.
J. Virol. 56, 414-418 (1985).
- (5) Hell, W., Randall, R. E., Modrow, S. und Wolf, H.:
Characterization and genomic localization of herpesvirus saimiri proteins with monoclonal antibodies and hybrid-selected translation.
10th International Herpesvirus Workshop at the University of Michigan, Ann Arbor (1985).
- (6) Hell, W. und Wolf, H.:
Characterization of H. saimiri proteins and their relatedness to EBV encoded polypeptides.
11th International Herpesvirus Workshop at the University of Leeds (1986).

- (7) Smith, E. P., Nicholas, J., Hell, W., Gompels, U. A., Knight, S., Craxton, M. und Honess, R. W.:
Unusual features of the regulation of transcription from the herpesvirus salmirl genome during a productive cycle of virus growth.
11th International Herpesvirus Workshop at the University of Leeds (1986).

- (8) Hell, W., Modrow, S. und Wolf, H.:
Charakterisierung von Herpesvirus-salmirl-induzierten Proteinen und Homologien zu Epstein-Barr-Virus.
Tagung der Sektion Virologie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Freiburg (1986).

- (9) Hell, W., Wagner, R. und Wolf, H.:
Transcriptional patterns of herpesvirus salmirl.
41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Heidelberg (1987).

- (10) Hell, W., Wagner, R. und Wolf, H.:
Immediate early gene expression of herpesvirus salmirl.
13th International Herpesvirus Workshop at the University of California, Irvine (1988).

- (11) Hell, W., Wagner, R. und Wolf, H.:
Immediate early gene expression of herpesvirus salmirl.
Joint Meeting of the Sektion Virologie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie and the Virus Group of the Society for General Microbiology, Hamburg (1988).

- (12) Wagner, R., Hell, W. und Wolf, H.:
Characterization of an immediate early transcript of herpesvirus salmirl.
Joint Meeting of the Sektion Virologie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Hamburg (1988).

- (13) Hell, W., Wagner, R. und Wolf, H.:
Immediate early gene expression of herpesvirus salmirl.
Manuskript eingereicht zur Publikation (1989).

- (14) Wagner, R., Hell, W. und Wolf, H.:
Analysis of immediate early transcription in herpesvirus saimiri infected
cells.
Manuskript eingereicht zur Publikation (1989).

II. Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Überlassung des Themas, für die finanzielle Unterstützung sowie für die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wolfhard Bandlow danke ich für die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich Biologie und für sein Interesse.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Deinhardt danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Frau Dr. Regine Scheld danke ich für die Unterstützung bei der Präparation des Retikulozytenlysats.

Frau Helga Schmidt danke ich für die fotografische Arbeiten bei der Anfertigung der Abbildungen.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. H. Wolf danke ich für die gute Zusammenarbeit, für nützliche Anregungen und Diskussionen.

Die vorliegende Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Wilhelm-Sander-Stiftung angefertigt.

III. Lebenslauf:

1. Persönliche Daten:

Name: Wolfgang Hell
Geburtsdatum: 25. April 1956
Geburtsort: Calmesweiler/Saar
Familienstand: ledig
Eltern: Erich Hell, Bundesbahnobersekretär
Martina Hell, geb. König, Hausfrau

2. Schulbildung:

1963 - 1966 Volksschule Calmesweiler
1966 - 1975 Realgymnasium Lebach/Saar
20.5.1975 Abitur

3. Wehrdienst:

1.7.1975 - 30.9.1976 Grundwehrdienst

4. Studium:

Wintersemester 1976/77: Beginn des Biologiestudiums (Diplom) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Wintersemester 1978/79: Vordiplom in Biologie
Sommersemester 1983: Diplom in Biologie (Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Zoologie und Biochemie; Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Wolf am Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie)
seit Wintersemester 1983/84: Doktorarbeit bei Prof. Dr. H. Wolf über Regulation der Genexpression bei Herpesviren

